

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**APLICACIÓN DE LA RESONANCIA DE PLASMÓN
SUPERFICIAL AL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN
CXCL12/CXCR4**

TESIS DOCTORAL
BEATRIZ VEGA BLANCO
MADRID, 2012

Este trabajo ha sido realizado en el departamento de Inmunología y Oncología
del Centro Nacional de Biotecnología,
bajo la dirección del Dr. José Mario Mellado García

A mis padres
A mi hermano

*Aquí no nos detendremos a mirar al pasado por
mucho tiempo.*

*Sigue siempre hacia adelante, abriendo puertas y
haciendo cosas nuevas. Se curioso... porque la curiosidad
nos hace seguir nuevos caminos.*

Walt Disney

AGRADECIMIENTOS

Al final escribir los agradecimientos resulta lo más difícil, tengo tanto que agradecer que no sé por donde empezar. Esta historia no tendría inicio sin la oportunidad y confianza que me han depositado muchas personas. De su mano he aprendido a conocer este maravilloso mundo y a crecer en el, y aunque ha sido un trayecto duro pero también ha sido a la vez muy gratificante. Por todo ello, quiero en primer lugar dar las gracias a Mario por haberme dado la ocasión de entrar en su laboratorio, de conocer la ciencia de su mano y de crecer a nivel científico durante estos cinco años.. A José Miguel por estar siempre disponible, aconsejarme y enseñarme. A Yolanda por darme todas las fuerzas necesarias para continuar y llegar al final de la etapa.

Quiero dar las gracias a todo mi laboratorio, como no a Laura, que a pesar de los buenos y malos momentos por los que hemos pasado siempre has estado para ayudarme, aconsejarme y guiarme. A Pili por echarme una mano siempre que lo he necesitado. A Anita por darme esa energía todas las mañanas. A Borja con quien empecé mis primeros pasos en el laboratorio y ahora terminamos juntos este periodo, gracias por darme otro punto de vista en los experimentos. A Gema gracias por esas pequeñas charlas de ánimo. A Rubén por esos cafés y esas charlas, por apoyarme tanto profesional como personalmente. A Dimitri, del que puedo decir que eres la persona que hace fácil cualquier situación complicada, por ser tan cercano. A Sunniva por transmitirme un gran optimismo y por esas miniquedadas tan reparadoras. A las últimas incorporaciones del laboratorio, Graciela, Anabel y Sofía, gracias por el aire fresco que ha entrado con vosotras, por la alegría que desprendéis, no la perdáis nunca y seguir luchando por lo que queréis.

A Julia que siempre que he necesitado un apoyo has estado ahí para escucharme y aconsejarme. A Laura B. por los pequeños momentos que hemos pasado.

Y agradecer al resto de compañeros del departamento, Abel, Javi, Vicen, Virginia, Jesús, Denise, Pedro, Leticia, Lidia, Kathy, María, Lola, Gema, Araceli, Rosa, Roberto y todos los que se me olvidan, gracias las meriendas y por vuestro apoyo, me llevo una gran pedacito de todos vosotros, he disfrutado mucho estos años. Y en particular quiero dar las gracias a Cristina por apoyarme, ayudarme y animarme tanto dentro como fuera del laboratorio, por la amistad de estos años porque sin ella no habría sido capaz de superar los obstáculos por los que he tenido que pasar.

Al servicio de citometría, M^a Carmen, Sara, Pablo, Sonia y Almudena, gracias por resolverme los problemas con los protocolos y animarme cuando los resultados no eran los esperados, por darme un la esperanza de que todo va a salir bien. A cocina por estar siempre dispuestos a hacer todo lo posible para que tengamos lo necesario para seguir cada día nuestra trayectoria. A Coral, por ayudarme con el papeleo, por estar siempre disponible para solucionar cualquier duda. A Cathy por soportarme con mis complicadas traducciones y enseñarme la forma correcta de escribir en

inglés. Y por último a Antonio que siempre ha estado ahí, tanto para cualquier pedido como para escucharme, animarme, y darme la confianza suficiente para mantenerme.

A mis amigos de la universidad, Elena, Marina, Diego, Víctor, Pablo y Jesús, por compartir grandes momentos a lo largo de todos estos años que llevamos juntos, por apoyarnos mutuamente y seguir animándonos a conseguir la meta por la que empezamos en la universidad. A Carolina, mi mejor amiga desde el parvulario, muchas gracias por animarme y apoyarme. Y a Belén quiero agradecer que estés cuando lo he necesitado, sé que puedo contar contigo para todo lo que me falte.

No se cuantas veces me han tenido que ayudar a levantarme y me han apoyado a seguir, muchas gracias papá y mamá por animarme a estudiar, por empujarme en los momentos complicados por los que hemos tenido que pasar. Gracias por intentar comprenderme para seguir por muy difícil que resulte el camino. A mi hermano José por estar siempre cuando le he necesitado aunque tengamos diferencias se que siempre va a ayudarme. A mi prima Manuela que aunque ella ya no está con nosotros y no va a verme terminar se que siempre estará conmigo apoyándome y animándome a conseguir lo que me proponga. A mi prima Sonia por haberme ayudado en los momentos difíciles por los que he pasado y por esos ánimos que me da para proseguir. Y en general a toda mi familia por el gran apoyo y los consejos que me han dado durante toda mi vida.

Y por último a Ángel, siento que hayas llegado a mi vida en un momento complicado, pero tengo que agradecerte que me hayas devuelto la ilusión, por creer en mi y animarme, por buscar el lado positivo de las cosas y por apoyarme a seguir. Siempre tienes las palabras adecuadas para conseguir sacarme una sonrisa cuando estoy triste, muchas gracias por estar a mi lado.

INDICE

SUMMARY	15
ABREVIATURAS	17
INTRODUCCIÓN	23
1. QUIMIOQUINAS	26
1.1. Clasificación	26
1.2. Estructura	26
1.3. Dimerización	27
2. LA QUIMIOQUINA CXCL12	28
2.1. Estructura	29
2.2. Dominio de unión de CXCL12 a su receptor	29
2.3. Dominio de unión de CXCL12 a glicosaminoglicanos	31
3. RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS	32
3.1. Clasificación	32
3.2. Estructura	32
3.3. Dimerización	34
3.4. Activación del receptor y señalización	35
3.5. El receptor de quimioquinas, CXCR4	36
4. PATOLOGÍAS QUE IMPLICAN EL CXCL12 Y CXCR4	38
4.1. Síndrome WHIM	38
4.2. Cáncer	38
4.3. Infección por VIH-1	39
4.4. Artritis reumatoide	39
5. GLICOSAMINOGLICANOS	40
5.1. Los glicosaminoglicanos y el CXCL12	41
6. RESONANCIA DE PLASMÓN SUPERFICIAL	42
6.1. Superficie del sensor	43
6.2. Diseño del experimento	43
6.3. Representación de la medida	44
6.4. Constantes cinéticas	44
6.5. Aplicaciones de la técnica	45
7. LOS VIRUS: FAMILIA RETROVIRIDAE	47
7.1. Lentivirus	47
7.2. Los vectores virales	48
OBJETIVOS	51

MATERIAL Y MÉTODOS	55
1. LÍNEAS CELULARES	57
2. ANTICUERPOS Y QUIMIOQUINAS	57
3. ANÁLISIS POR CITOMETRIA DE FLUJO	57
4. INMUNOFUORESCENCIA	58
5. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PARTICULAS LENTIVIRALES	58
6. TITULACIÓN DE LAS PARTÍCULAS LENTIVIRALES	59
7. ACOPLAMIENTO DE LAS PARTÍCULAS LENTIVIRALES A BOLAS DE LATEX	59
8. WESTERN BLOT	59
9. INMUNOENSAYOS ENZIMÁTICOS	60
9.1. ELISA para partículas lentivirales	60
9.2. ELISA para CXCL12 humano	60
10. DETECCIÓN POR INMUNO-ORO DE RECEPTORES EN PARTÍCULAS LENTIVIRALES	61
11. CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE RECEPTORES EN LAS PARTÍCULAS LENTIVIRALES	61
12. BIOCENSORES ÓPTICOS	61
12.1. Biosensor experimental	61
12.2. Biosensor comercial	61
13. INMOVILIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES EN LA SUPERFICIE DEL BIOCENSOR EXPERIMENTAL	62
14. INMOVILIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES EN BIACORE	63
15. ANÁLISIS CINÉTICO EN BIACORE	63
16. MUESTRAS DE ORINA	64
17. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	64
RESULTADOS	67
1. ANÁLISIS DE LOS RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS USANDO LAS PARTÍCULAS LENTIVIRALES	69
1.1. Generación de partículas lentivirales que presenten el receptor CXCR4	69
1.2. Detección de la presencia del CXCR4 en las partículas lentivirales	69
1.3. Cálculo de la expresión de CXCR4 en las PLVX4	71
1.4. Generación de partículas lentivirales que presenten otros receptores de quimioquinas, por ejemplo el CCR5	72
2. ESTUDIO DEL RECEPTOR CXCR4 A TRAVÉS DE LA RESONANCIA DE PLASMÓN SUPERFICIAL	73
2.1. Condiciones de inmovilización de las PLVX4 en el biosensor experimental	73
2.2. Especificidad de las PLVX4 en el biosensor experimental	74
2.3. Regeneración de la superficie del sensor	75
2.4. Reproducibilidad y reusabilidad de la superficie	75

3. APLICACIONES DEL BIOSENSOR.....	78
3.1. Detección de CXCL12 en fluidos biológicos	78
3.1.1. Estudio de la interacción de la orina en el biosensor experimental.....	78
3.1.2. Comparación SPR vs. ELISA de las muestras de orina	80
3.2. Estudio de las constantes cinéticas del complejo CXCL12/CXCR4	81
3.2.1. Inmovilización de las PLVX4 en el biosensor comercial.....	81
3.2.2. Unión específica de CXCL12	82
3.2.3. Reproducibilidad y regeneración de la superficie.....	83
3.2.4. Cinética de CXCL12 a CXCR4 en las partículas lentivirales.....	83
3.2.5. Aumento de la expresión del CXCR4 en las partículas lentivirales	84
3.2.6. Estudio de las partículas virales que presentan CXCR4 y CCR5.....	86
3.3. Efecto de los glicosaminoglicanos en la unión de CXCL12 al receptor CXCR4.....	88
3.3.1. Cinética de los glicosaminoglicanos y CXCL12 al receptor CXCR4 en las partículas lentivirales.....	88
DISCUSIÓN	93
Desarrollo de la técnica y caracterización de las partículas lentivirales como vehículo portador de los receptores de quimioquinas.....	96
Análisis de muestras biológicas, aplicación del desarrollo de nuestro sistema	98
Parámetros físico-químicos de la unión de CXCL12 a CXCR4 y efecto de la presencia de glicosaminoglicanos.....	99
CONCLUSIONES	103
BIBLIOGRAFÍA	107
ANEXO I (publicaciones relacionadas con la tesis)	125
ANEXO II (otras publicaciones)	145

SUMMARY

Surface plasmon resonance (SPR)-based biosensors are established tools for measuring molecular interactions, and could provide an ideal method to evaluate G protein-coupled receptor (GPCR) binding interactions. All current SPR methods are based on capture of solubilized GPCR prior to their reconstitution in a lipid environment, however, and require the use of detergents and substantial protein purification prior to analysis.

Based on a model using the chemokine receptor CXCR4 and its specific ligand, CXCL12, we outline a biosensor-based method to determine the binding parameters of this interaction. This highly reproducible technique circumvents the limitations of the direct immobilization approach, as well as the need for detergents. CXCR4 in the context of the cell membrane is incorporated into lentiviral particles, which approximates *in vivo* conditions. Virions prepared from transfected cells bearing the receptor are easily purified and attached to the biosensor surface. Binding of specific antibodies and of CXCL12 demonstrates the structural integrity of CXCR4 and the specificity of the interaction. Other chemokines do not interact, and CXCL12 binding is abrogated by incubation of the lentiviral particles with the CXCR4 antagonist AMD3100. The method shows a relative standard deviation of <10% and chip-to-chip variation <12%, with stability of the sensor response for more than 100 measurements in the same chip.

The application of biosensor technology to clinical sample testing is nonetheless difficult, due mainly to non-specific interactions caused by the complex nature of biological fluids. Use of specific antibodies helps to minimize background signals and to increase assay sensitivity; detection nonetheless depends on epitope recognition by the antibody, which often does not distinguish active from inactive analytes. This problem is solved when the native receptor for a protein can be associated to a flow chamber surface. We developed this SPR system to detect CXCL12 in urine samples from rheumatoid arthritis (RA) patients, who have elevated CXCL12 levels in plasma and synovial fluid. The sample requires no pretreatment, and the method is sufficiently sensitive and reproducible to detect variations in protein concentration. The use of lentiviral particles allowed us to determine in real-time kinetic parameters for the CXCR4/CXCL12 interaction, and to evaluate the effect of glycosaminoglycan/chemokine complexes on binding to the immobilized receptor. The data indicate that, at low concentrations, GAG modulates the CXCR4/CXCL12 interaction and in excess, blocks it. These observations suggest a role for GAG in modulating local chemokine availability as well as the receptor/ligand interaction.

The use of lentiviral particles to present cell membrane proteins allows detailed study of ligand interactions using optical biosensors in conditions that approximate the *in vivo* context, including cell membrane lipid composition, receptor conformations, and the presence of other proteins that could modulate binding parameters. The approach has clear utility for drug discovery research, as it facilitates screening for agonist/antagonist effects and simplifies biomarker detection in biological fluids.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AR	Artritis reumatoide
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albúmina sérica bovina
CHO	células de ovario de hámster
EDC	1-etil-3-(3dimetil-amino-propil) carbodiimida
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERK	Proteína quinasa regulada por señales extracelulares
FCS	Suero de ternera fetal
G-CSF	Factor estimulador de granulocitos
GAG	Glicosaminoglicano
GFP	Proteína verde fluorescente
GP	Glicoproteína
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GRK	Quinasas asociadas a receptores acoplados a proteínas G
HBS	Tampón salino de Hidroxietil piperazina etanolsulfonato
HEK293T	Línea estable de células embrionarias de riñón humano
HeLa	Línea inmortal de células humanas de cáncer cervical
HS	Heparan sulfato
HT29	Línea inmortal de células de adenocarcinoma humano
IFNγ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
Il-6	Interleuquina 6
JAK	Quinasa de la familia Janus
k_a	Constante de asociación
K_D	Constante de afinidad
k_d	Constante de disociación
kDa	Kilo Dalton
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
Met-S³⁵	Metionina marcada con azufre 35
NHS	N-hidroxisuccinimida
p24	Proteína de la cápside del virus (24 KDa)
PBS-P	Tampón salino fosfato con polioxietilen sorbitan 20

PBS-T	Tampón salino fosfato con tween 20
PG	Proteoglicano
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinasa
PLC	Fosfolipasa C
PLVR5	Partículas lentivirales CCR5
PLVX4	Partículas lentivirales CXCR4
PLVX4X4	Partículas lentivirales CXCR4
RMN	Resonancia magnética nuclear
RTL	Repetición larga terminal
RSD%	Desviación estándar relativa
RU	Unidades de resonancia
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SD	Desviación estándar
SEM	Desviación media estándar
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SPR	Resonancia de plasmón superficial
STAT	Activadores de la transcripción y traducción de la señal
TA	Temperatura ambiente
TIR	Reflexión interna total
TNF	Factor de necrosis tumoral
TU	Unidades de transducción
U.A.	Unidades arbitrarias
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

INTRODUCCIÓN

El sistema inmune depende de la señalización de las quimioquinas para dirigir la migración de los linfocitos, organizar las respuestas inflamatorias y estimular la cicatrización. La migración celular es un complejo proceso que conlleva varios pasos donde las quimioquinas juegan un papel central (Baggiolini, 1998); en este movimiento participan también de forma coordinada selectinas, integrinas y citoquinas. Las quimioquinas son secretadas al medio extracelular y presentadas por los glicosaminoglicanos (GAG) en el endotelio celular (Doranz et al., 1999) a sus receptores en lugares específicos donde promueven las señales necesarias para que la migración celular ocurra (Figura 1) (Middleton et al., 1997). Además de su función en la homeostasis del sistema inmunológico, las quimioquinas resultan críticas en el desarrollo de procesos inflamatorios y de hecho altos niveles de estos ligandos se han detectado localmente en tejidos inflamados y también en circulación sistémica de pacientes con cáncer o procesos autoinmunes como artritis reumatoide, lupus o esclerosis múltiple (Szekanecz et al., 2003). Este hecho revela un potencial uso de las quimioquinas como biomarcadores en estados patológicos con valor diagnóstico y de respuesta a los tratamientos. Aunque existen varios inmunoensayos basados en el uso de anticuerpos monoclonales para su detección, éstos no son capaces de diferenciar entre moléculas activas e inactivas, aspecto muy relevante ya que las quimioquinas son dianas de sulfataciones, citrulinizaciones y proteólisis que alteran su funcionalidad. El diseño de un sistema de detección basado en el reconocimiento por su propio receptor resuelve esta situación dado que solo las quimioquinas capaces de unirse a él son detectadas.

El uso de biosensores para diagnóstico se ha incrementado en los últimos años por ser una técnica muy rápida, sensible, que permite la evaluación en tiempo real de la interacción y no requiere manipulación de ligandos ni de receptores. En este trabajo hemos desarrollado un biosensor basado en la inmovilización de partículas virales que contienen CXCR4, un receptor de quimioquinas, para detectar su ligando específico, CXCL12 y lo hemos utilizado para el estudio de los parámetros cinéticos que rigen la interacción ligando/receptor, para evaluar el efecto de otras proteínas que pueden afectar a la unión, y para cuantificar los niveles de la quimioquina en orina de pacientes con artritis reumatoide. El método es muy robusto, reproducible y tiene suficiente sensibilidad para la evaluación de quimioquinas en muestras biológicas, además será también de utilidad en los programas de evaluación de agonistas y antagonistas que algunas compañías realizan utilizando a las quimioquinas como dianas.

1. QUIMIOQUINAS

1.1. Clasificación

Las quimioquinas son una familia de proteínas de bajo peso molecular (8-10 kDa) con capacidad atrayente y proinflamatoria que actúan sobre distintas poblaciones leucocitarias. En función de sus características estructurales y de la localización cromosómica de sus respectivos genes, las quimioquinas se clasifican en cuatro familias. Dos familias mayoritarias, denominadas CC o β -quimioquinas, y CXC o α -quimioquinas; y otras dos familias minoritarias, la familia C y la familia CX3C. Actualmente, sin embargo, se prefiere una clasificación basada en criterios funcionales, y así hablamos de quimioquinas homeostáticas e inflamatorias (Cyster, 1999; Zlotnik and Yoshie, 2000). Las quimioquinas homeostáticas son expresadas constitutivamente en tejidos específicos, donde participan en la activación y migración de distintas poblaciones leucocitarias para organizar la arquitectura de los órganos linfoides. Por el contrario, las quimioquinas inflamatorias participan en procesos inflamatorios y su producción es inducida por estímulos proinflamatorios.

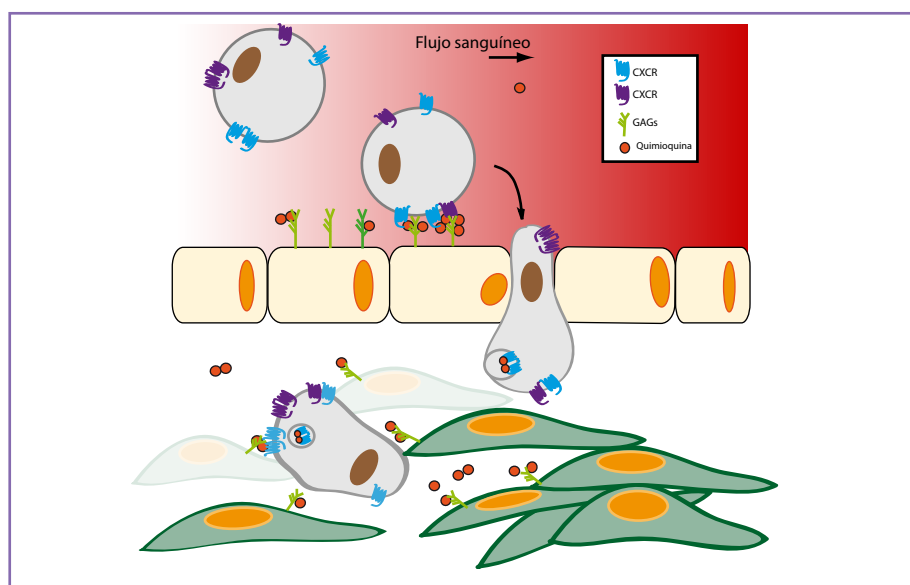


Figura 1. **Esquema del modelo secuencial de extravasación a los tejidos.** Tras la fase de rodamiento dirigida por selectinas, las células encuentran quimioquinas asociadas a glicosaminoglicanos que reconocen sus receptores. Como consecuencia las integrinas resultan saturadas y se produce la adhesión firme de la célula. Finalmente, las células siguiendo el gradiente quimioatrayente y las integrinas como fuerza tractora, se extravasan y llegan al tejido.

1.2. Estructura

Estudios por resonancia magnética nuclear (RMN) y cristalografía demuestran que la mayoría de las quimioquinas tienen una estructura terciaria similar (Allen et al., 2007; Handel and Domaille, 1996) estabilizada por la presencia de 1 a 3 puentes disulfuro que definen y estabilizan su arquitectura. Presentan un dominio amino terminal flexible, seguido de tres láminas- β

antiparalelas y una hélice- α en el carboxilo terminal. Las dos primeras cisteínas y la región N-terminal confieren flexibilidad a esta región, tal y como confirman los estudios de RMN donde indican que el bucle N, situado en el N-terminal, es una de las regiones con mayor flexibilidad y variabilidad de la proteína (Clark-Lewis et al., 1995). Esta flexibilidad es importante para la unión y activación del receptor. La estructura cuaternaria es sin embargo más variada, algunas quimioquinas están constitutivamente en forma de monómeros, aunque la mayoría se asocian entre sí mediante residuos del N-terminal (CC quimioquinas) o por la primera lámina- β (CXC quimioquinas) para formar homo- y heterodímeros (Bacon et al., 2002). Las diferentes estructuras cuaternarias que adoptan las quimioquinas de la familia CC, CXC y CX3C podrían explicar la unión específica de cada una de ellas a su receptor (Kim et al., 1996).

Por otro lado, las quimioquinas de la familia CXC, dependiendo de la presencia en la región N-terminal de una secuencia triaminoacídica (glutámico-leucina-arginina), a la que se denomina ELR (Moore et al., 1998), se clasifican en quimioquinas ELR⁺, específicas de células mieloides y que promueven angiogénesis (CXCL2/Gro- β , CXCL3/Gro- γ , CXCL6/GCP-2, CXCL8/IL-8, CXCL7/NAP-2, CXCL1/MGSA o GRO- α , CXCL5/ENA-78). Y en quimioquinas ELR⁻, que atraen a una gran variedad de leucocitos e inhiben la angiogénesis, es decir, con características angiostáticas (CXCL4/PFA4, CXCL14, CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG y CXCL11/ITAC). CXCL12/SDF-1 es, sin embargo, una excepción porque posee actividad angiogénica careciendo del motivo ELR.

1.3. Dimerización

Aunque funcionalmente se consideró artefactual, las quimioquinas en solución a alta concentración, o bien unidas a otras proteínas como la heparina, son capaces de oligomerizar (Blanpain et al., 1999a). De hecho los complejos diméricos u oligoméricos son la forma biológicamente activa *in vivo* (Doranz et al., 1999). Las quimioquinas CC se asocian por la formación de una lámina- β antiparalela interaccionando con residuos cercanos al N-terminal e incluyendo las dos primeras cisteínas. La dimerización en este caso, es por lo tanto una combinación de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. El resultado final es una estructura alargada con bastante flexibilidad para ambas subunidades. En el caso de las quimioquinas de la familia CXC, presentan en la primera cadena de la lámina- β un mayor número de residuos hidrofóbicos (40%-80%) y son precisamente estos los que participan en las interacciones entre las dos subunidades del dímero formando un puente de hidrógeno. Cuando la estabilización de la conformación dimérica se produce por los extremos C-terminal de las hélices- α de ambas quimioquinas y las láminas- β se originan conformaciones globulares (Kanagarajadurai and Sowdhamini, 2008).

2. LA QUIMIOQUINA CXCL12

El factor derivado de células de estroma-1 (SDF-1/CXCL12) es una quimioquina de la familia CXC que regula la quimiotaxis de leucocitos (Baggiolini, 1998), la diferenciación de linfocitos T (Sallusto et al., 1998), y participa en neovascularización (Zou et al., 1998) y en el reclutamiento de precursores osteoclasticos (Grassi et al., 2004; Kortessidis et al., 2005). CXCL12 es esencial para del desarrollo el corazón, gónadas, sistema nervioso y vasos sanguíneos, los ratones con deleciones del gen de *Cxcl12* mueren durante el periodo perinatal por defectos en hematopoyesis (Nagasawa et al., 1996b; Zou et al., 1998). En pez cebra se ha demostrado que CXCL12 es crucial para la localización de las células germinales en el primordio de las gónadas (Boldajipour et al., 2011; Doitsidou et al., 2002).

Los receptores de CXCL12, son CXCR4 y CXCR7, presentan un amplio patrón de expresión en los tejidos de mamíferos. Ambos receptores contribuyen de forma diferente a las respuestas mediadas por CXCL12, por ejemplo la señalización por CXCL12 en las células progenitoras renales humanas a través de CXCR7 activa la supervivencia celular y la adhesión al endotelio, mientras que vía el CXCR4 se activa la quimiotaxis (Mazzeinghi et al., 2008). No obstante parece más aceptado en el campo que el verdadero papel de CXCR7 es el de modulador de la señalización promovida vía CXCR4 (Levoye et al., 2009; Sierro et al., 2007). CXCL12 y CXCR4, participan en el tráfico de linfocitos, hematopoyesis y desarrollo fetal (Doitsidou et al., 2002; Moepps et al., 2000; Nagasawa et al., 1996a; Rossi and Zlotnik, 2000; Zou et al., 1998). CXCL12 y CXCR4 también tienen un papel activo en patologías como cáncer (Muller et al., 2001), infección por VIH (Bleul et al., 1996), síndrome de WHIM (Hernandez et al., 2003), y enfermedades autoinmunes, como osteoartritis o artritis reumatoide (Hansen et al., 2006).

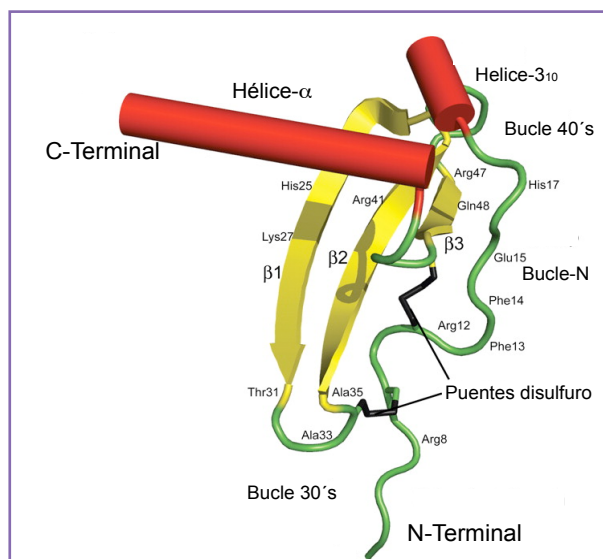


Figura 2. Representación de la estructura de un monómero de CXCL12. Cada elemento estructural está marcado en un color, las hélices- α son cilindros rojos, las láminas- β son amarillos y las regiones flexibles son verdes. Los enlaces de puentes disulfuro están en negro. Imagen procedente del artículo de Murphy et al. 2007.

2.1. Estructura

CXCL12 tiene poca homología con otras quimioquinas de la familia CXC. El gen que codifica CXCL12 se encuentra en el cromosoma 10 (Shirozu et al., 1995), mientras que los genes de las quimioquinas CXC se encuentran en el cromosoma 4. También tiene un mayor grado de conservación inter-especies que otras quimioquinas, con un 99% de identidad entre las secuencias de humano y ratón (Shirozu et al., 1995).

Se han identificado seis variantes de CXCL12 (α , β , γ , δ , ϵ y ϕ) en humanos (Yu et al., 2006). La isoforma más abundante, CXCL12 α , está compuesta por 68 aminoácidos, y el análisis de su estructura por RMN y cristalografía demuestra que presenta un ensamblaje típico de las quimioquinas estabilizado por dos puentes disulfuro. Consiste en un dominio N-terminal poco estructurado (Lys¹ – Tyr⁷), seguido de un largo bucle (Bucle-N, bucle flexible del N-terminal), una hélice- α 3₁₀, tres láminas- β anti-paralelas y una hélice- α en el dominio C-terminal (Figura 2). Todas las demás isoformas comparten los tres primeros exones con la isoforma α (68 residuos), pero difieren en su cuarto exón lo que confiere un dominio C-terminal específico para cada isoforma. Por ejemplo, CXCL12 β , tiene una secuencia idéntica a CXCL12 α , con una extensión de 4 residuos en el extremo C-terminal (Tashiro et al., 1993), y CXCL12 γ presenta una secuencia de 30 residuos más en el dominio carboxilo terminal (Laguri et al., 2007).

La estructura cuaternaria del CXCL12 descrita por RMN determinó una forma monomérica a pH 4,9 (Baik et al., 1999), mientras las estructuras diméricas de cristal fueron obtenidas en presencia de sulfato de amonio a pH 7,0 y 8,5 (Dealwis et al., 1998). El estudio analítico por ultracentrifugación en solución de fosfato a pH 7,4 reveló un equilibrio entre monómero y dímero (Holmes et al., 2001). La acidez del pH promueve el estado monomérico por desestabilización de la estructura dimérica, mientras el pH fisiológico y la presencia de aniones, incluyendo el fosfato, sulfato y citrato, desplazan el equilibrio hacia el estado dimérico (Veldkamp et al., 2005). *In vitro* los dímeros de CXCL12 producen movilización de calcio pero no dan lugar a migración celular. Por consiguiente es posible que, las quimioquinas estén en un equilibrio dinámico entre monómero y dímero, aunque sean las formas diméricas u oligoméricas las necesarias para activar las células *in vivo* (Salanga and Handel, 2011; Veldkamp et al., 2005).

2.2. Dominio de unión de CXCL12 a su receptor

Varios estudios de RMN usando péptidos del dominio N-terminal del CXCL12 han demostrado interacciones directas con los dominios centrales del receptor (Eliseeva et al., 2000). La estructura del dominio N-terminal del receptor CXCR4 ha sido definida y contiene tres residuos tirosina sulfatados que unen un dímero de CXCL12 con alta afinidad ($K_D = 2 - 38\text{nM}$) (Amara et al., 1999; Crump et al., 1997; Di Salvo et al., 2000; Laguri et al., 2007; Veldkamp et al., 2008). Cada residuo sulfotirosina del receptor ocupa un único sitio en la quimioquina. Estos residuos crean un motivo altamente ácido que se complementa con el epitopo básico del ligando. La aparente modularidad en la unión y la función de señalización ha llevado a generar el modelo de “dos sitios” donde la

quimioquina se uniría al receptor por su dominio central, denominado REFESH (residuos 12-17), “sitio uno”. Posteriormente, el N-terminal de la quimioquina actuaría como la señal de activación “sitio dos” en la zona central del receptor (Figura 3). Los estudios con quimeras indican que la región N-terminal y la región REFESH contienen los residuos esenciales para la completa función del CXCL12 (Baik et al., 1999; Crump et al., 1997).

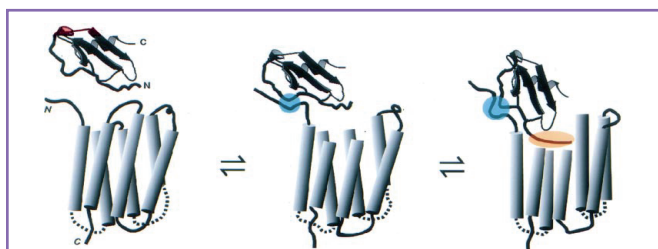


Figura 3. **Mecanismo de “dos sitios” para la interacción de CXCL12 con CXCR4.** El primer paso de la interacción entre el CXCL12 y el CXCR4 se produce por el N-terminal del receptor y la zona REFESH del CXCL12 (sitio 1). La región de contacto se representa en azul. Dos de las hélices están truncadas para remarcar la unión al receptor. El dominio N-terminal del CXCL12 se une a la zona transmembrana del receptor (sitio 2), activándolo y provocando un cambio conformacional y la activación de la proteína G. Diagrama obtenido del artículo de *Crump et al. 1997*.

Utilizando técnicas de transferencia de saturación cruzada (TCS), un método de RMN, se ha propuesto recientemente que la unión de quimioquinas al receptor se produce por el dominio N-terminal, la lámina-β1 y un lado de la lámina-β2, junto con el bucle 50s de CXCL12 que interacciona con la región extracelular del CXCR4 (Kofuku et al., 2009). El dominio N-terminal del CXCR4 se uniría al bucle-N de CXCL12, y el N-terminal interaccionaría con la zona transmembrana del receptor, pero no se conoce de forma precisa la configuración (Figura 4). Estos experimentos fueron realizados usando CXCL12 monomérico, por lo que se desconocen si los complejos oligoméricos actuarían de igual modo.

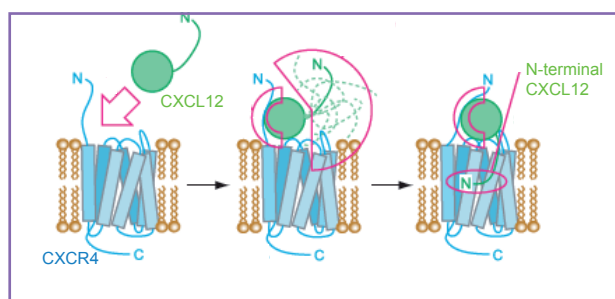


Figura 4. **Diagrama del segundo mecanismo de interacción propuesto para el CXCL12 y el CXCR4.** Primer paso, la interacción del CXCL12: la lámina-β, el bucle 50's y el bucle-N con el región extracelular del CXCR4 facilitan una rápida unión y un eficiente anclaje. El N-terminal del CXCL12 es dinámico en ese estado, y es usado para buscar la unión en la zona transmembrana del receptor. El segundo paso en la interacción entre el N-terminal del CXCL12 y la región transmembrana del CXCR4, activándose el cambio conformacional en el receptor e induciendo la señalización por la proteína G. Esquema según *Kofuku et al. 2009*.

2.3. Dominio de unión de CXCL12 a glicosaminoglicanos

Existen evidencias de que la actividad de las quimioquinas *in vivo* requiere su asociación a glicosaminoglicanos (GAG) mediante interacciones directas (Handel et al., 2005). Aunque el mecanismo que explica este hecho no está completamente dilucidado, se cree que los GAG unidos a proteoglicanos se acomplejan a las quimioquinas, y es este complejo el que facilita la dimerización e incrementa la concentración local, permitiendo la formación de los gradientes quimioatrayentes (Parish, 2005). CXCL12 posee alta afinidad por heparan sulfato (HS) y heparina de bajo y alto peso molecular (Blanpain et al., 1999b). La carga positiva de CXCL12 interacciona con la carga negativa de los GAG a través de interacciones electrostáticas específicas. Usando mutagénesis dirigida se identificó el motivo BBXB (lisina 24, histidina 25 y lisina 27) en la primera lámina- β como el dominio de unión a GAG. Por datos de RMN y cristalografía se ha mostrado que el dominio de unión del CXCL12 al GAG se encuentra separado estructuralmente del dominio de unión a su receptor (Figura 5) (Murphy et al., 2007).

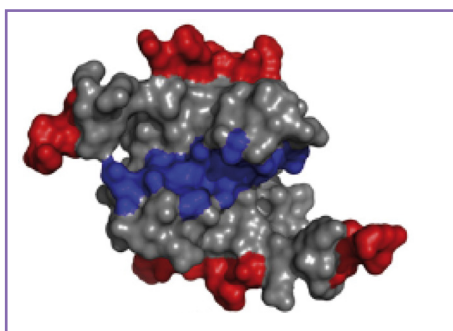


Figura 5. **Dímero de CXCL12**, con los dominios de unión al receptor (rojo) y a los glicosaminoglicanos (azul). Esquema procedente de Laguri et al. 2008.

Las diferentes isoformas de CXCL12 presentan residuos de unión diferentes a los GAG. El CXCL12 α tiene un sólo dominio de unión, mientras que el resto de isoformas contienen además un segundo dominio de unión a GAG en el cuarto exón, desde los 4 residuos de más que presenta CXCL12 β hasta los 30 residuos de CXCL12 γ (Rueda et al., 2008; Sadir et al., 2001). Este dominio, que permanece desplegado, parece funcionar como estabilizador del complejo quimioquina/HS (Figura 6). En combinación con el primer dominio de unión a GAG por la lámina- β , hace que la isoforma CXCL12 γ presente una mayor afinidad por HS que el resto de las isoformas (K_D 0,9 nM) (Laguri et al., 2007; Rueda et al., 2008). Además, hay que destacar también que el CXCL12 γ tiene afinidad por la heparina, el heparan sulfato y el dermatan sulfato, en cambio, el CXCL12 α no se une al dermatan sulfato.

Aunque la unión al GAG y al receptor se realiza por diferentes dominios del CXCL12, altas concentraciones de GAG bloquean el dominio N-terminal de la quimioquina, inhibiendo su unión al receptor CXCR4. Varios laboratorios han mostrado que la heparina soluble y el heparan sulfato a altas dosis inhiben la respuesta de los linfocitos al CXCL12 (Kuschert et al., 1999), y así mismo, la heparina de bajo peso molecular (Tinziparin) inhibe la unión del CXCL12 en las células CHO que expresan el CXCR4 y en varias líneas celulares humanas de cáncer de mama, bloqueando en consecuencia la señalización (Harvey et al., 2007).

3. RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS

3.1. Clasificación

Los receptores de quimioquinas pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), y se clasifican en cuatro grupos en función de la quimioquina que unen (CCR, CXCR, CX₃CR o XCR). En realidad un receptor puede unirse a más de un ligando y una quimioquina puede unir más de un receptor (Tabla 1) (Mantovani, 1999), por lo que se define una elevada promiscuidad entre receptores y quimioquinas que, sin embargo, podría no ser tan alta ya que a veces dos ligandos de un mismo receptor producen cinéticas diferentes de activación en algunas cascadas de señalización (Borroni et al., 2010; Mantovani, 1999). También se incluyen en esta familia los receptores silenciosos llamados “*scavenger*”, D6 y DARC o Duffy, que son receptores no funcionales (Locati et al., 2005), el receptor CCX CKR (Gosling et al., 2000) y algunos receptores expresados por virus (van Berkel et al., 2000).

El hecho de que unan quimioquinas homeostáticas o inflamatorias, permite también una clasificación según participen en desarrollo y homeostasis, o en procesos inflamatorios (Johnson et al., 2005b). Así por ejemplo, CCR7 o CXCR4 son receptores homeostáticos mientras CCR2 o CCR5 son inflamatorios.

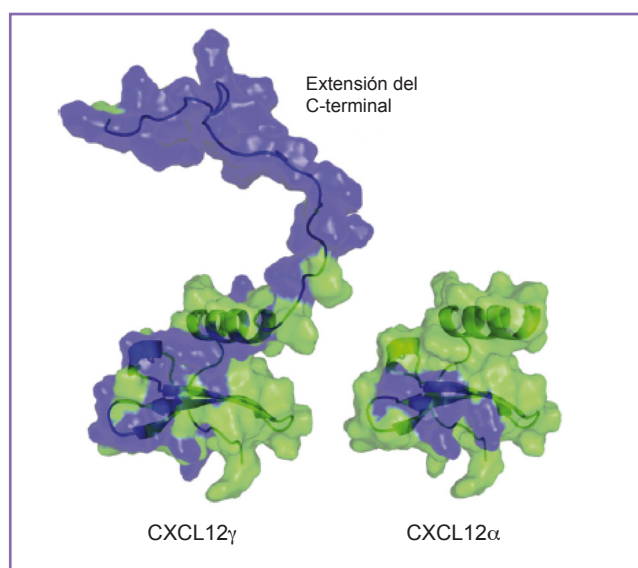


Figura 6. **Isoformas CXCL12 α y CXCL12 γ .** Los sitios de unión a los GAG en el CXCL12 α y CXCL12 γ están en color morado. La isoforma gamma se caracteriza por tener un C-terminal mayor, flexible y de gran afinidad por el heparan sulfato y el dermatan sulfato.

3.2. Estructura

Los receptores de quimioquinas están formados por una única cadena polipeptídica que consta de unos 350 aminoácidos (aproximadamente 40 KDa). Tienen un dominio N-terminal corto, siete dominios transmembrana helicoidales, tres bucles intracelulares, tres bucles hidrofílicos extracelulares, y un extremo C-terminal que contiene residuos serina y treonina importantes para la regulación del receptor (Murphy, 1994). Su estructura tridimensional es en forma de barril definido por las regiones transmembrana. Los dos primeros bucles extracelulares de los receptores

Tabla 1. Familia de receptores de quimioquinas y las quimioquinas que unen.

Receptores	Quimioquinas
CCR1	CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (Rantes), CCL7 (MCP-3), CCL14 (HCC1)
CCR2	CCL2 (MCP-1), CCL8 (MCP-2), CCL7 (MCP-3), CCL13 (MCP-4), CCL16 (HCC4)
CCR3	CCL11 (eotaxina), CCL14 (eotaxina-2), CCL7 (MCP-4), CCL5 (Rantes), CCL8 (MCP-2), CCL13 (MCP-4)
CCR4	CCL17 (TARC), CCL22 (MDC)
CCR5	CCL3 (Mip-1 α), CCL4 (Mip-1 β), CCL5 (Rantes), CCL11 (eotaxin), CCL14 (HCC1), CCL6 (HCC4)
CCR6	CCL20 (Mip-3 β)
CCR7	CCL19 (ELC), CCL21 (SLC)
CCR8	CCL1 (I309)
CCR9	CCL25 (TECK)
CCR10	CCL27 (CTACK), CCL28 (MEC)
CXCR1	CXCL6 (GCP2), CXCL8 (IL-8)
CXCR2	CXCL1 (GRO α), CXCL2 (GRO β), CXCL3 (GRO γ), CXCL5 (ENA-78), CXCL6, CXCL8
CXCR3-A	CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC)
CXCR3-B	CXCL4 (PF4), CXCL9, CXCL10, CXCL11
CXCR4	CXCL12 (SDF-1)
CXCR5	CXCL13 (BCA-1)
CXCR6	CXCL16 (SR-PSOX)
CX ₃ CR1	CX3CL1 (fractalquina)
XCR1	XCL1 (linfotactina), XCL2

de quimioquinas presentan residuos de cisteína conservados que permiten la formación de un puente disulfuro y contribuye a la estabilización de la estructura. Las proteínas G se acoplan al dominio C-terminal del receptor junto con el segundo y tercer bucle intracelular lo que resulta crítico para iniciar la señalización intracelular después de la activación del receptor (Baldwin, 1994).

En el segundo bucle intracelular existe un motivo altamente conservado en esta familia, DRYLAIV, que está implicado en la activación de la señalización intracelular y que es específico para los receptores de quimioquinas (Figura 7). La unión del ligando al receptor provoca un cambio en la conformación de éste, de tal forma que la tirosina del motivo DRY, originalmente orientada hacia el interior del barril, queda expuesta hacia el citoplasma para iniciar la señalización. De hecho, el mutante CCR2bY139F que carece de esa tirosina no es un receptor funcional (Mellado et al., 1998) y los receptores no funcionales, D6 y Duffy, también carecen de este motivo.

Aunque hasta ahora los modelos se basaban en la estructura del receptor bovino de la rodopsina (Palczewski et al., 2000), el receptor β_2 adrenérgico en vertebrados (Cherezov et al., 2007; Rasmussen et al., 2007; Rosenbaum et al., 2007), y la bacteriorodopsina en organismos

unicelulares (Henderson et al., 1990; Henderson and Schertler, 1990) únicos cristalizados. Recientemente la estructura cuaternaria del CXCR4 ha sido descrita gracias a su cristalización en presencia de moléculas pequeñas antagonistas y péptidos cíclicos (Figura 8) (Wu et al., 2010). Ha sido ésta la primera estructura en alta resolución de un receptor de quimioquinas. Comparado con los otros receptores cristalizados, el CXCR4 presenta un sitio de unión a ligando mayor y más abierto que otros GPCR activados por pequeñas moléculas, y la parte intracelular se encuentra más conservada con los otros GPCR descritos que la parte extracelular (Wu et al., 2010).

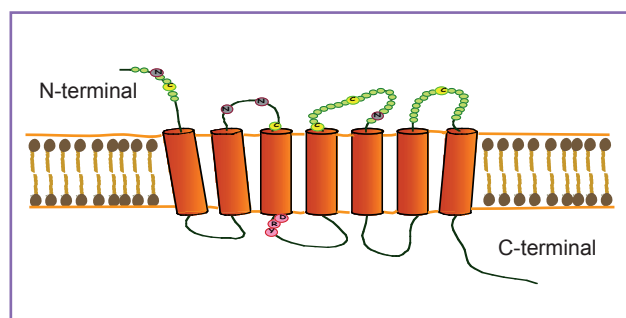


Figura 7. Esquema de la estructura de un receptor de quimioquinas en la membrana celular. Los receptores presentan una única cadena polipeptídica que atraviesa la membrana siete veces (cilindros naranjas). Un N-terminal y tres bucles extracelulares, implicados en la unión al ligando; y el C-terminal junto con tres bucles intracelulares implicados en la señalización. Se destaca el dominio DRY en el segundo bucle intracelular implicado en la activación de la señalización.

3.3. Dimerización

Igual que se han descrito para varios GPCR (Terrillon and Bouvier 2004), los receptores de quimioquinas existen en la membrana celular formando homo- y heterodímeros. El uso de técnicas de co-inmunoprecipitación y transferencia de energía por resonancia de fluorescencia o bioluminiscencia (FRET y BRET) ha permitido demostrar la oligomerización de estos receptores, y que los complejos se formen durante la síntesis y maduración en el retículo endoplasmático (Issafras et al., 2002). Estudios similares realizados *in vitro* sobre-expresando receptores han demostrado que el fenómeno de dimerización es general y todos los receptores de quimioquinas pueden formar homo- y heterodímeros (Munoz et al. 2011). Además, experimentos realizados en neutrófilos donde se expresan CXCR1 y CXCR2 han confirmado que homo- y heterodímeros forman un equilibrio en la membrana celular que es dependiente de la expresión de los receptores y de la presencia de los ligandos (Martinez Munoz et al., 2009). Aunque todavía no está completamente definida la relevancia funcional de estos complejos, algunas evidencias indican que juegan un papel en la modulación de la señalización promovida por los receptores individuales, como ocurre en el caso del heterodímero CXCR4/CXCR7 (Levoye et al., 2009; Sierro et al., 2007). En otros casos se han asociado también a señalización diferente, por ejemplo los heterodímeros CCR2/CCR5 activan la proteína G, y provocan una cinética de activación de PI3K diferente a la que presenta la activación de los receptores expresados individualmente.

La dimerización de CXCR4 ha sido confirmada en los experimentos de cristalización antes aludidos (Wu et al., 2010), en presencia de péptidos cíclicos los receptores CXCR4 interaccionan por las hélices III y IV, y el segundo bucle intracelular. Asimismo parece que la unión del péptido induce una pequeña inclinación de la parte extracelular de la hélice V, que lleva a la

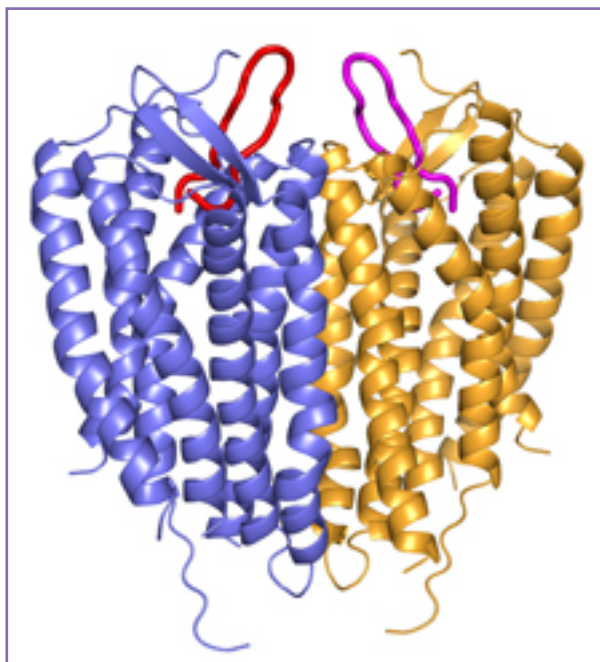


Figura 8. **Estructura de CXCR4 formando un dímero.** El receptor CXCR4 se representa una cadena color azul y otro receptor CXCR4 en color amarillo, con el N-terminal (34 residuos) y los bucles extracelulares (ECL 1, 2 y 3) unidos a péptidos (rojo y magenta). Imagen de *Raymond C. Stevens*.
Figura 9. **Vía de señalización intracelular del**

parte intracelular del receptor opuesto a acercarse. Este cambio conformacional inducido por el ligando podría explicar como éste estabiliza la conformación dimérica así como la cooperatividad observada con ciertos ligandos de CXCR4. Específicamente, la unión de un ligando a un receptor podría inducir un cambio estructural en la hélice V del segundo receptor, modificando la afinidad de unión del ligando al segundo receptor, dando como resultado una cooperatividad negativa o positiva. Esta estructura del CXCR4 mostrada como homodímero no es la única vista sino que previamente se ha mostrado que heterodimeriza con receptores como el CCR2 y CCR5, ambos complejos muestran unión de cooperatividad negativa con sus ligandos no sólo *in vitro* sino también *in vivo* (Isik et al., 2008; Percherancier et al., 2005; Sohy et al., 2009). Además la dimerización también se ha propuesto como mecanismo para explicar la dominancia del mutante de CXCR4 sobre el receptor silvestre, que se produce en el síndrome de WHIM (Balabanian et al., 2005; Lagane et al., 2008), lo cual explica su hiperactivación.

3.4. Activación del receptor y señalización

La unión de la quimioquina al receptor promueve la asociación de la proteína G heterotrimérica ($\alpha\beta\gamma$). La proteína G se disocia, de tal forma que la subunidad α permanece unida al receptor, mientras que el complejo $\beta\gamma$ queda asociado a la membrana celular activando el resto de la cascada de señalización. Existen varios tipos de proteínas G dependiendo de la naturaleza de la subunidad α , así se han dividido en 4 grupos principales: α_s , α_i , α_q y α_{12} (Oldham and Hamm, 2008). Sin embargo, la proteína G implicada en la señalización por quimioquinas es mayoritariamente una proteína G_{α_i} , lo que hace que sea sensible al tratamiento con toxina de pertussis (Simon et al., 1991). Aunque se han descrito también la asociación de otras proteínas G como G_{13} o G_q en un proceso que parece depender del tipo celular estudiado. Dependiendo

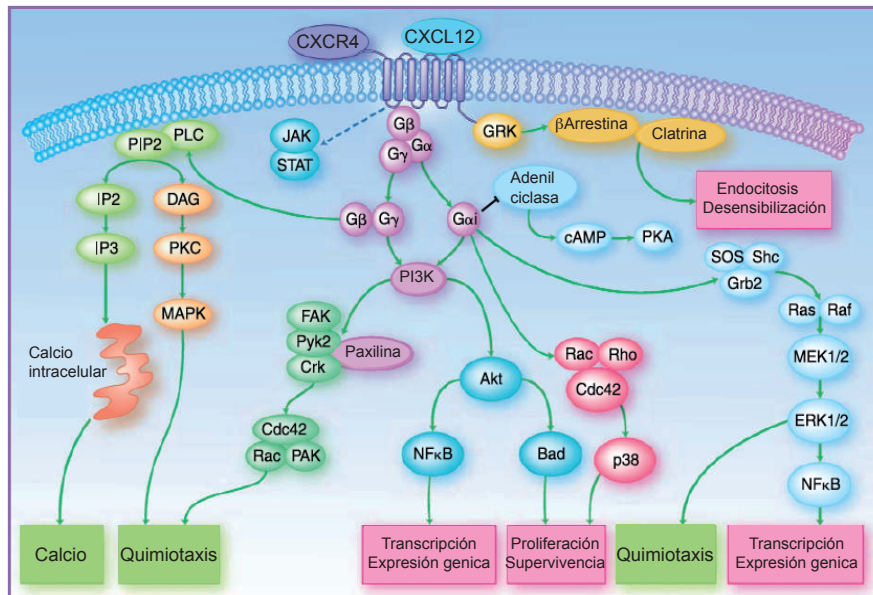
de la proteína G, las quimioquinas activan la fosfolipasa C (PLC), la quinasa que fosforila en 3'fosfatidil-inositoles (PI3K) y las MAPK (del inglés, *Mitogen Activated Protein Kinase*) entre otras rutas. También se ha descrito que en algunos sistemas celulares las quimioquinas activan la ruta JAK/STAT, las Janus quinasas (JAK) son reclutadas al receptor tras la unión al ligando, se activan por transfosforilación y activan a los factores de transcripción (STAT).

En el caso concreto de CXCL12 y CXCR4 la activación incluye proteínas como, G α i, G α q, G α 0 y G α s (Maghazachi, 1997; Rubin, 2009). Se ha descrito, además, que la unión de CXCL12 resulta en un rápido reclutamiento de JAK quinasas de manera independiente a la proteína G α i (Vila-Coro et al., 1999). Dependiendo de la activación de la proteína G α i, CXCL12 promueve la activación de PI3K, Erk1/2 y la fosforilación de tirosinas en las proteínas de la adhesión focal (Zhang et al., 2001). Concretamente se ha descrito que el segundo y tercer bucle intracelular junto al dominio del C-terminal de CXCR4 soportan la unión de la proteína G α i, la activación de MAPK p42/44, y el resto de rutas señalizadoras (Figura 9) (Roland et al., 2003). Existen evidencias de una heterogeneidad conformacional de CXCR4 en la superficie de la célula, a veces relacionada con modificaciones post-translacionales (Baribaud et al., 2001) como por ejemplo, la sulfatación o glicosilación que se ha visto influyen en la unión del ligando y en la posterior señalización (Farzan et al., 1999).

La señalización de CXCR4 es rápidamente desensibilizada después de la unión del ligando por internalización del receptor. El dominio C-terminal del CXCR4 es fosforilado en residuos serina por las quinasas de receptores de proteínas G (GRK) (Rubin, 2009), seguido del reclutamiento de la β -arrestina y la endocitosis mediada por clatrina (Cheng et al., 2000). Los pacientes con el síndrome WHIM presentan una desregulación en la internalización debido a la truncación del dominio C-terminal del CXCR4 que impide la normal función de la GRK3 (Balabanian et al., 2008) y por ello CXCR4 señala de manera continuada (Hernandez et al., 2003; Kawai and Malech, 2009).

3.5. El receptor de quimioquinas, CXCR4

CXCR4, es uno de los 19 receptores de quimioquinas conocidos en humanos, es activado exclusivamente por la quimioquina CXCL12. CXCR4 juega un papel esencial en el tráfico de células madre durante la embriogénesis, la organogénesis y la regeneración de tejidos y órganos (Wysoczynski et al., 2005). Los ratones deficientes en CXCR4 tienen un fenotipo letal con defectos en la linfopoyesis de las células B, en la mielopoyesis, en la vascularización del tracto gastrointestinal, en la formación cardíaca del septum ventral, y en el desarrollo del cerebelo (Nagasawa et al., 1996a; Zou et al., 1998). CXCR4 ha sido también asociado con más de 23 tipos de cáncer donde participa en metástasis, angiogénesis y en el crecimiento/supervivencia del tumor (Muller et al., 2001; Teicher and Fricker, 2010; Zlotnik, 2008). Además, es correceptor de las cepas T-trópicas del virus VIH-1 que causa el SIDA (Bleul et al., 1996).



CXCR4. La activación del CXCR4 mediante la unión al CXCL12 desencadena una variedad de respuestas fisiológicas, tales como la quimiotaxis, la supervivencia y la proliferación celular, y la transcripción génica. Esos efectos dependen de distintos mediadores inflamatorios. Imagen adaptada de *Teicher and Fricker, 2010*.

4. PATOLOGÍAS QUE IMPLICAN EL PAR CXCL12 Y CXCR4

4.1. Síndrome WHIM

El síndrome WHIM se caracteriza por hipogamaglobulinemia, neutropenia asociada con la retención de neutrófilos senescentes en la médula ósea (conocida como mielocatexis), infecciones bacterianas constantes, linfopenia de células B y T, y susceptibilidad a la infección por Papilomavirus (produciendo verrugas y carcinomas) (Balabanian et al., 2005; Hernandez et al., 2003; Kawai and Malech, 2009). Este raro desorden se encuentra asociado a la herencia heterocigota de mutaciones dominantes del gen que codifica al receptor CXCR4, el cual origina un C-terminal deleccionado impidiendo la regulación negativa de la señalización. Algunos individuos que presentan todo el cuadro clínico portan también el gen silvestre de *Cxcr4*, sin por ello ser posible el control de la activación. A pesar de la heterogeneidad genética, en general los leucocitos de los pacientes con WHIM tienen una continua señalización por CXCL12, y como consecuencia los neutrófilos maduros permanecen retenidos en la médula por daño en la sensibilización e internalización del receptor (Kawai and Malech, 2009). La mayoría de los tratamientos son fenotípicos incluyendo G-CSF (factor estimulador de granulocitos), inmunoglobulinas sustitutivas y profilaxis antibiótica, sin embargo una nueva estrategia es el uso del inhibidor específico de CXCR4, el AMD3100, que permite el bloqueo de la señalización continuada (Dotta et al., 2011).

4.2. Cáncer

El eje CXCL12/CXCR4 esta involucrado en la progresión tumoral incluyendo angiogénesis, metástasis y supervivencia (Balkwill, 2004). CXCL12 retiene células de leucemia linfoide y mioeloide aguda en la médula ósea (Juarez et al., 2007; Nervi et al., 2009).

CXCR4 también está altamente expresado en células de cáncer de mama en humanos, en tumores malignos de mama y en tumores metastáticos (Muller et al., 2001). Las células de cáncer de mama que expresan este receptor están agresivamente metastatizadas en órganos secundarios, donde la expresión de CXCL12 está significativamente incrementada (Muller et al., 2001).

Otros cánceres en los que esta fuertemente expresado el CXCR4 es en el cáncer pancreático, donde se encuentra significativamente asociado con su avance (Wehler et al., 2006). CXCR4 se expresa en altos niveles y su activación por CXCL12 induce respuestas de migración e invasión, y adhesión de células tumorales a la médula en el cáncer de pulmón (Burger and Kipps, 2006), lo cual confiere resistencia y facilita el crecimiento tumoral.

En el cáncer de ovario, el CXCR4 es un receptor dominante (Balkwill, 2004), el CXCL12 dirige la proliferación de las células tumorales, la cual puede ser bloqueada por anticuerpos neutralizantes frente al CXCR4 o con inhibidores (Scotton et al., 2002). En pacientes con cáncer colorrectal y melanoma, la expresión de CXCR4 en células de tumores primarios correlaciona con la metástasis y la supervivencia (Kim et al., 2006) aunque se sugieren otras vías para el establecimiento y la localización de los tumores en la médula (Scala et al., 2005).

4.3. Infección por VIH-1

El virus VIH-1 entra en las células diana a través de un proceso de fusión de membranas iniciado por la unión de la glicoproteína de la envuelta viral gp120, al CD4 presente en la célula huésped (Deng et al., 1996; Feng et al., 1996). Esta interacción modifica la conformación de la gp120 posibilitando su unión a un correceptor, CXCR4 o CCR5 (Wu et al., 1996). El uso del correceptor es tan importante que incluso permite clasificar las cepas del VIH-1 en T-trópicas si usan CXCR4, M-trópicas si usan CCR5, o dualtrópicas si usan los dos indistintamente.

Las quimioquinas actúan como inhibidores de la entrada del VIH, probablemente por bloqueo de los sitios de unión en los receptores de quimioquinas, requeridos para la interacción de la gp120, y/o por inducción de la internalización del receptor (Oberlin et al., 1996). También el uso del inhibidor AMD3100 funciona como un potente antiviral frente a las cepas de virus X4 y X4/R5 del VIH, inhibiendo la señalización de calcio inducida por CXCL12 y la quimiotaxis *in vitro* (Viola et al., 2008).

4.4. Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR), enfermedad inflamatoria crónica que afecta aproximadamente al 1% de la población mundial, se caracteriza por una inflamación crónica de múltiples articulaciones, proliferación de células sinoviales, infiltración masiva de leucocitos en las articulaciones inflamadas, y destrucción de cartílago y hueso de las articulaciones afectadas (Morimoto et al., 1988).

En la patogénesis de la AR están involucradas citoquinas inflamatorias, como la interleuquina-6 (IL-6), interferón- γ (IFN- γ), y los factores de necrosis tumoral (TNF- α y - β) (Nanki et al., 2000). Nanki et al describió que las células T CD4+ expresaban altos niveles de receptor CXCR4, y que la concentración de CXCL12 estaba también aumentada en el sinovio de los pacientes con AR, sugiriendo que el CXCR4 es importante para la retención de células T en los tejidos afectados. Se sabe que los niveles de CXCL12 en plasma y líquido sinovial están elevados por lo que su presencia podría convertirse en biomarcador de la enfermedad. Además remarca la importancia de CXCL12 en artritis, el hecho de que el uso de anticuerpos neutralizantes bloquean la migración *in vitro* de células Th1 aisladas del fluido sinovial (Salcedo et al., 1999). Los resultados indican que el desarrollo de inhibidores que bloqueen la interacción CXCR4/CXCL12 podrían funcionar como terapia para la enfermedad.

5. GLICOSAMINOGLICANOS

Los glicosaminoglicanos (GAG) son polisacáridos largos, lineales y heterogéneamente sulfatados (Turnbull et al., 2001). Las principales clases de GAG incluyen heparina, heparan sulfato, condroitin sulfato, dermatan sulfato, queratan sulfato y ácido hialurónico (Hunt and Dayhoff, 1970). Con excepción de los GAG solubles, ácido hialurónico y heparina, el resto están asociados a membranas celulares unidos a una gran variedad de proteínas denominadas proteoglicanos (PG). Los proteoglicanos representan una clase especial de glicoproteínas que están altamente glicosiladas. Consisten en un centro proteico con una o más cadenas de GAG unidas covalentemente. Los PG se expresan de forma ubicua en la superficie celular y en la matriz extracelular. Sus funciones pueden ser atribuidas tanto al centro proteico como a las cadenas GAG unidas. Por ejemplo, el heparan sulfato une 5 clases de proteínas, las cuales presentan un tamaño desde 32 a 500 KDa y comprenden aproximadamente el 95% de los PG. De ellos, los sindecanos son los más abundantes y presentan una región transmembrana que los une a la superficie celular (Bernfield et al., 1999). Se han identificado cuatro miembros de esta familia con tamaños comprendidos entre los 20 y 40 KDa, que participan en la unión a factores de crecimiento como bFGF, HGF, EGF, (Zimmermann and David, 1999). Los otros proteoglicanos que presentan heparan sulfato son el perlecano, agrina y colágeno XVIII, y están asociados a la matriz extracelular (Figura 10).

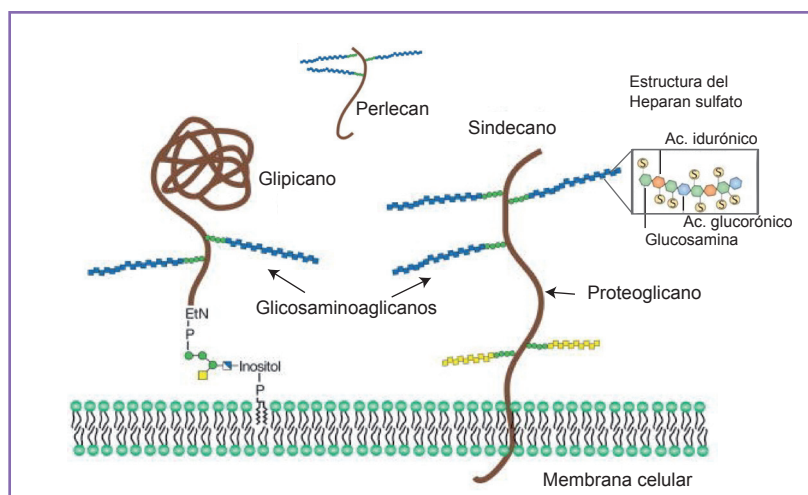


Figura 10. **Esquema de un glicosaminoglicano.** Los proteoglicanos consisten en una proteína central (marrón) y una o más cadenas de GAG (azul) unidos. El disacárido básico que forma el GAG presenta un ácido urónico que puede ser ácido idurónico o ácido glucurónico; y una glucosamina. Los dos monosacáridos se unen entre sí mediante enlaces del tipo (1 β .4). La longitud de la cadena del heparan sulfato es de alrededor de 100 disacáridos. Los proteoglicanos pueden estar anclados en la membrana como el sindecano, o pueden ser unidos por un anclaje de GPI (glicofosfatidilinositol), como los glipicanos. Otros son secretados a la matriz extracelular, como el perlecano.

Los GAG también interaccionan con las quimioquinas en las células endoteliales y en la matriz extracelular (Handel et al., 2005; Johnson et al., 2005a). De hecho, esa unión incrementa la concentración de quimioquinas y es imprescindible para su función *in vivo* (Parish, 2005). En ausencia de tales interacciones la rápida difusión de las quimioquinas, especialmente en el flujo sanguíneo, disiparía los gradientes y como resultado la concentración de quimioquinas estaría por debajo del umbral requerido para activar a sus receptores. Mutantes de RANTES/CCL5, MCP-1/CCL2 y Mip1 β /CCL4 que no unen la heparina pero mantienen intacta su capacidad de unión a los receptores y promover migración celular *in vitro*, no poseen actividad *in vivo*, demostrando la importancia de la interacción con los GAG para la función *in vivo* (Doranz et al., 1999).

Casi todas las quimioquinas son proteínas altamente básicas con muchos residuos de arginina, lisina e histidina en su superficie, y por lo tanto presentan un punto isoelectrico cercano a 9, lo que posibilita su unión a los GAG cuya naturaleza es mas ácida. Como excepción existen dos quimioquinas ácidas, MIP1 α /CCL3 y MIP1 β /CCL4, ambas unen también GAG pero con menor afinidad que el resto de las quimioquinas básicas (Koopmann and Krangel, 1997). Se sabe que las quimioquinas oligomerizan en los GAG, por ejemplo se ha visto que CCL2 forma dímeros en solución pero tetrameros en presencia de GAG (Lau et al., 2004). Existe variabilidad en los sitios de unión propuestos y además se han sugerido mecanismos de localización de las quimioquinas, donde la interacción del GAG podría añadir especificidad en la función de la quimioquina (Handel et al., 2005; Johnson et al., 2005a).

5.1. Los glicosaminoglicanos y el CXCL12

Se ha descrito que las quimioquinas de la familia CC, presentan carga positiva en el extremo C-terminal de su hélice- α para la unión a los GAG (Koopmann and Krangel, 1997). En cambio, las quimioquinas de la familia CXC interaccionan con los GAG por otros dominios diferentes a la hélice- α . En concreto, el CXCL12 a diferencia de otros CXC, muestra un dominio hidrofóbico central. La orientación de la hélice- α y un agrupamiento de cargas, hacen que dicha hélice- α tenga carga negativa, en cambio los residuos básicos de la primera lámina- β exhiben una carga positiva y representan la región apropiada para la interacción con el HS. Se ha caracterizado que el CXCL12 α interacciona selectivamente con el heparan sulfato ($K_D = 93$ nM), a través del grupo de residuos básicos de la primera lámina- β (Laguri et al., 2007; Valenzuela-Fernandez et al., 2001). Dado que la unión del CXCL12 al CXCR4 se produce utilizando otro dominio, se hipotetizó que podría formarse un complejo heteromérico que incluyese CXCL12, CXCR4 y HSPG, hipótesis certificada mediante diferentes aproximaciones experimentales (Valenzuela-Fernandez et al., 2001). A parte del HS, el CXCL12 α es también capaz de unirse a la heparina (Murphy et al., 2007).

6. RESONANCIA DE PLASMÓN SUPERFICIAL

Las bases de la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) se encuentran en los estudios del patrón de difracción discontinua después de irradiar un metal con una luz policromática (Wood, 1901). Y se entienden como las fluctuaciones de densidad, que se propagan a través de una interfaz metal y un dieléctrico. Fueron *Otto* (Otto, 1968) , y simultáneamente, Kretschmann en 1968

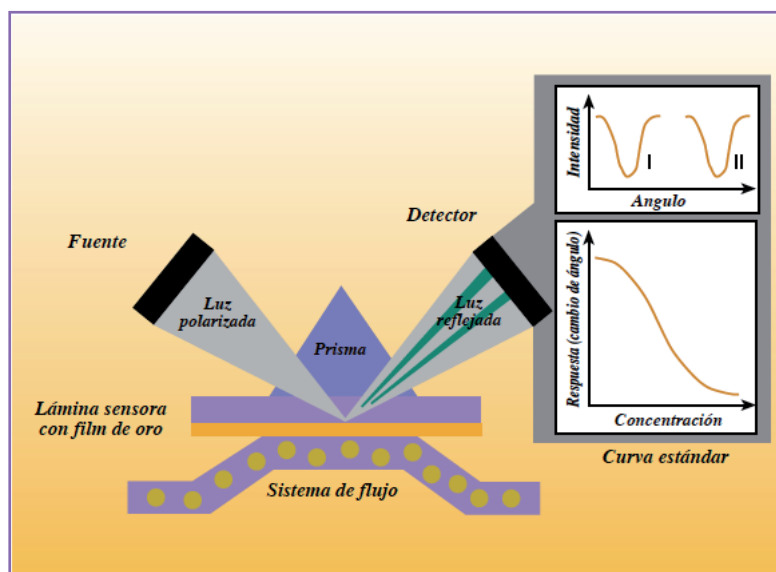


Figura 11. **Principio de la resonancia de plasmón superficial** . La luz incidente es reflejada y el detector es capaz de transmitir la señal y convertirla en una curva SPR medible (sensorgrama).

(Kretschmann et al., 1968) quienes describieron la excitación de los plasmones de superficie bajo el modo de la reflexión total interna (TIR, que es el fenómeno que se produce cuando un rayo de luz atraviesa un medio con distinto índice de refracción y es refractado), y sentaron las bases para el uso de este fenómeno en la medida de las interacciones biomoleculares.

La SPR es, por tanto, un fenómeno que ocurre al medir la luz polarizada bajo condiciones de TIR, en una superficie metálica conductora como es el oro (también puede emplearse plata, cobre y aluminio), siendo la interfaz entre medios de diferente índice de refracción: el prisma de cristal de la superficie (alto índice de refracción) y el tampón (bajo índice de refracción). La luz polarizada que cubre un rango de ángulos de incidencia, es dirigida hacia la cara del cristal en contacto con la superficie del sensor y es recogida por un detector (Figura 11). Un campo eléctrico de intensidad conocido, como onda evanescente, se genera cuando la luz atraviesa el cristal. Esta onda evanescente interacciona con, y es absorbida por, nubes de electrones libres en la superficie del oro, generando oscilaciones de electrones cargados, denominados plasmones que causan la reducción en la intensidad de la luz reflectada. El ángulo de resonancia al cual esta intensidad mínima ocurre es una función del índice de refracción de la solución cercana a la capa de oro en la cara opuesta de la superficie del sensor. Si sobre la superficie se deposita masa y dado que los cambios de índice de refracción del solvente se dan cerca de la superficie, el ángulo de resonancia variaría permitiendo entonces estudiar la asociación entre proteínas.

Existen tres componentes principales para todos los biosensores ópticos de afinidad, un detector, el cual usa la SPR para monitorizar los cambios de índice de refracción en la superficie; el tampón que pasa sobre el sensor, el cual rápidamente introduce y elimina el analito (biomolécula que pasa sobre la superficie en la solución) durante el experimento de unión; y la superficie del sensor donde se inmoviliza el ligando usando un método de acoplamiento. Cuando los ligandos son inmovilizados a la superficie, las ondas pueden ser usadas para monitorizar su reacción de unión. Como las respuestas de unión en los instrumentos de SPR están basadas en masa, los analitos usados no necesitan ser marcados con sondas fluorescentes o radiactivas. El pequeño volumen de los canales permite, además, un rápido intercambio entre los reactantes y el tampón, minimizando así el agotamiento de la muestra durante la reacción.

6.1. Superficie del sensor

Existe una amplia variedad de superficies químicas diseñadas para aplicaciones específicas. La superficie mas común contiene dextrano carboximetilado, que genera un entorno tridimensional. Otras superficies adecuadas incluyen una baja carga, dextrano más corto o alcanos hidrofóbicos, aunque también puede usarse la superficie de oro limpia. Para poder depositar las proteínas de interés que posibilitarán después estudiar las interacciones de los analitos, deben primero activarse los grupos carboxilo presentes en los extremos de los alcanotioles del dextrano absorbido con 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropil)-carbodiimida (EDC). La reacción origina un ester inestable, que se estabiliza con N-hidroxysuccinamida (NHS) formándose un éster de NHS, que al reaccionar con los grupos amino presentes en la proteína a inmovilizar da lugar a un enlace amida.

6.2. Diseño del experimento

Existen dos métodos generales de diseño del experimento, por inmovilización directa o por captura. Cuando se trabaja con interacciones macromoleculares la inmovilización directa consiste en unir covalentemente el ligando a la superficie usando un acoplamiento amino, carboxilo, tiol o carbohidrato, dependiendo de los grupos reactivos disponibles. En la inmovilización por captura, el ligando se une a la superficie usando moléculas intermediarias, por ejemplo biotina/estreptavidina, proteína A o anticuerpos monoclonales.

En cualquier caso, la inmovilización requiere que la solución tenga baja concentración de sal y que el pH se encuentre ligeramente por debajo del punto isoeléctrico de la proteína a inmovilizar, ya que de ese modo se facilita que la carga positiva de la molécula sea atraída por la carga negativa de la superficie. Finalmente, deben neutralizarse los ésteres succinimidil que no han unido proteína, y eliminar todo el material que no se ha unido covalentemente usando etanolamina.

6.3. Representación de la medida

Una vez inmovilizada la proteína de interés en la superficie del sensor se inyecta el tampón en el que diluiremos posteriormente el analito problema. La señal SPR comienza con una línea base que se corresponde con el tampón que está pasando sobre la superficie. Al inyectarse la muestra (el analito) se produce un cambio de índice de refracción instantáneo debido a la variación de composición del tampón. Durante la inyección, el analito se une al receptor en la superficie del biosensor lo que provoca el cambio de índice de refracción y, por lo tanto, un cambio de ángulo de SPR. Este cambio de ángulo en función del tiempo de inyección es transformado matemáticamente en lo que se denomina sensorgrama, que representa en el eje x el tiempo, y en el eje y las unidades de resonancia (RU). Cuando la muestra deja de pasar y vuelve el tampón inicial, la señal disminuye hasta estabilizarse debido a la muestra que quedó interaccionando con la proteína inmovilizada en el sensor. El mantenimiento de esa condición permite también estudiar la disociación en tiempo real entre el analito y el receptor. La medida termina con una solución de regeneración que elimina lo unido a la superficie y deja el sistema listo para ser reutilizado (Figura 12).

6.4. Constantes cinéticas

Además de seguir las interacciones en tiempo real, los programas matemáticos incorporados, permiten analizar los parámetros cinéticos, es decir, calcular la afinidad a través de las constantes de asociación (k_a) y disociación (k_d). A partir de las cuales puede conocerse, la constante de afinidad (K_D) que rige la interacción y que se define como el ratio entre la constante de disociación y asociación. El periodo durante el cual se inyecta el ligando se denomina “fase de asociación”, y el periodo que coincide con la posterior inyección del tampón una vez la interacción es estabilizada se llama “fase de disociación” (Figura 12). Durante la fase de asociación hay simultanea asociación y disociación. El equilibrio se alcanza cuando la velocidad de asociación es igual a la velocidad de disociación. Un problema importante en estos experimentos es el conocido como efecto de transporte de masas que afecta a la difusión del analito sobre la superficie del biosensor y, por lo tanto, a su accesibilidad al receptor inmovilizado. Para evitarlo se usa una baja densidad de inmovilización del receptor y se selecciona la velocidad de flujo apropiada a fin de conseguir una señal de detección apropiada.

Una vez realizadas las detecciones necesarias, el programa informático permitirá mediante cálculos matemáticos obtener las constantes que rigen la interacción. La fiabilidad del cálculo de las constantes de afinidad es obviamente dependiente de la fiabilidad de las constantes cinéticas (por ejemplo, el modelo apropiado usado para el cálculo y la calidad de los datos experimentales). Pequeños cambios en la k_a y k_d en direcciones opuestas tienen grandes efectos en el cálculo de la constante de afinidad. En el caso de las interacciones sencillas se aplica el modelo de *Langmuir* que implica una interacción 1:1, con interacciones en un único sitio para

analitos heterogéneos y ligandos heterogéneos. Para predefinir un modelo para analitos bivalentes y dos fases de interacción, el significado de la constante de afinidad es menos evidente y se basa en aproximaciones matemáticas que usan las constantes de velocidad para la unión inicial y el cambio conformacional promovido como consecuencia de la primera unión.

El mejor modo para validar el ajuste es calcular los análisis de equilibrio que muestran las repuestas de unión en el equilibrio (R_{eq}) versus la concentración del analito. De dicho ajuste se extrae después la constante de afinidad. La K_D obtenida de la reacción de equilibrio debe ser la misma que la K_D calculada en los valores individuales de las constantes k_a y k_d .

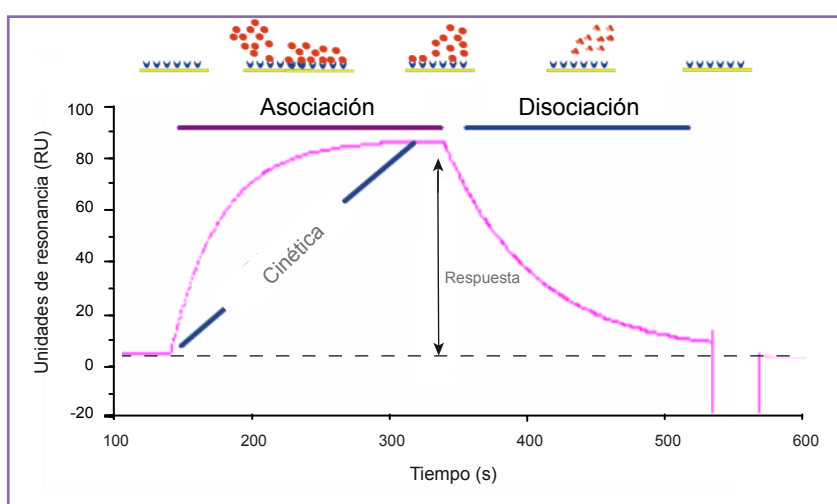


Figura 12. **Sensorgrama, representación de los datos del SPR.** El sensorgrama es la curva que representa los cambios de índice de refracción debidos a las fases de la asociación y disociación de los complejos que se forman en la superficie a tiempo real entre el ligando y el analito.

6.5. Aplicaciones de la técnica

Las primeras aplicaciones de los biosensores fueron detectar moléculas en muestras complejas. Así se desarrollaron aplicaciones para el control de calidad y seguridad de muestras con aplicaciones desde la detección de organismos patógenos a residuos, hormonas, toxinas y contaminantes medio ambientales. Son, sin embargo, las aplicaciones focalizadas en la monitorización en tiempo real de la asociación entre proteínas, y los estudios de afinidad para búsqueda de anticuerpos y el descubrimiento de drogas farmacéuticas, las aplicaciones más utilizadas en la actualidad.

La tecnología basada en SPR para estudiar la interacción entre ligandos y receptores celulares requiere tener el receptor purificado en una alta concentración que permita depositarlo en la superficie del biosensor. La situación es muy compleja cuando el receptor a analizar es un miembro de la familia de los GPCR, debido a su alta complejidad estructural y la necesidad de un ambiente hidrofóbico que mantenga su estructura y su capacidad de unir ligando. Extraer estos receptores de la membrana celular requiere el uso de detergentes y condiciones que generalmente modifican su estructura, y por ello, también su capacidad de unir ligando.

El primero en usar un biosensor para estudiar un GPCR fue *Karlsson*, quien inmovilizó el receptor de la rodopsina reconstituyendo un ambiente lipídico en la superficie (*Karlsson and Lofas, 2002*). Este método, sin embargo, requiere un tremendo esfuerzo en la purificación del GPCR antes del análisis y además el proceso de unión covalente por grupos amino no tiene un sitio específico por lo que la inmovilización puede bloquear el sitio de unión del ligando. Una modificación de esta captura fue propuesta por el grupo de *Myszka*, que utilizó un método de dos pasos, concentración del GPCR desde una preparación celular cruda y captura con anticuerpos monoclonales para asegurar una correcta orientación y posterior reconstitución del ambiente lipídico de la membrana en el sensor (*Stenlund et al., 2003*). Sin embargo, el método no elimina la solubilización inicial y el hecho de que el detergente alterase el receptor (*Navratilova et al., 2005*). Posteriormente, se emplearon partículas retrovirales como vía de incluir y depositar receptores en el contexto de la membrana celular. En este caso se utiliza la capacidad de los virus para llevarse parte de la membrana celular al salir de la célula huésped (*Hoffman et al., 2000*). En todo caso, el valor del SPR en la detección es que evita el marcaje de los analitos y, por lo tanto, también aquellos factores que puedan alterar la unión del ligando al receptor.

7. LOS VIRUS: FAMILIA RETROVIRIDAE

Un virus es un agente infeccioso microscópico que sólo puede multiplicarse dentro de las células de otros organismos. Los virus infectan todos los tipos de organismos, desde animales y plantas, hasta bacterias y arqueas (Weiss, 1987). De ellos los retrovirus, incluidos en la familia *Retroviridae*, son pequeños microorganismos que contienen una única cadena de ácido ribonucleico (ARN). En su ciclo vital es crítica la acción de la transcriptasa reversa ya que convierte su ARN genómico en doble cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN), y posteriormente permite la integración de éste último en los cromosomas de la célula huésped en lo que se denomina fase de provirus endógeno (Coffin, 1979). La familia de los retrovirus ha sido subclasificada en tres subfamilias: oncornavirus, lentivirus y espumavirus (Weiss, 1996).

7.1. Los lentivirus

Los lentivirus es un género de virus de la familia *Retroviridae*, caracterizada por su largo periodo de incubación (Levy, 1993). Los lentivirus pueden incorporar una gran cantidad de información en el ADN de la célula huésped, lo que constituye uno de los métodos más eficientes de propagación de vectores víricos. Curiosamente, los lentivirus son capaces de infectar células vecinas, en contacto directo con la célula huésped, sin necesidad de generar partículas extracelulares. Los lentivirus atrajeron la atención de la investigación en terapia génica (Verma and Somia, 1997) por la habilidad que tenían de integrarse en las células tanto en división como en aquellas que no se dividen, por ejemplo las neuronas (Bukrinsky et al., 1993). Como todos los retrovirus, los lentivirus insertan su genoma en las células infectadas del hospedador resultando una expresión del gen a largo plazo.

El paso más importante en el ciclo del retrovirus es la conversión del ARN viral simple en ADN de doble cadena por medio de la transcriptasa inversa en el citoplasma de la célula infectada. La molécula lineal de ADN se traslada al núcleo donde se integra en el ADN celular por medio de la enzima integrasa. El ADN provírico integrado es transcrito por completo por medio de la maquinaria celular produciendo ARN que sirve tanto como ARNm para la transcripción a proteínas virales, como de propio genoma que se incluirá en el interior de la cápside de los viriones. Dos copias de ARN genómico se empaquetan en cada virión haciendo a estos viriones organismos diploides. La salida de los viriones se produce por los dominios de membrana enriquecidos en glicolípidos que son zonas organizadas de la superficie de la células enriquecidas en colesterol, esfingolípidos y fosfatidilinositol unido a proteínas (Nguyen et al., 1999). En ese contexto el proceso de salida de la partícula viral hace que incorpore parte de la membrana celular y, por lo tanto, de las proteínas que contenga (Nguyen et al., 1999). Esta membrana permanecerá unida mediante interacciones electrostáticas (Pettersson and Ashbolt, 2001).

7.2. Los vectores virales

Los vectores retrovirales son probablemente los más apropiados para ser herramientas en la integración de un gen de forma estable en el genoma y su propagación a las células hija, de ahí su interés en la terapia génica. De ellos son los vectores lentivirales los preferidos ya que sólo se transducen en células en división y tienen un limitado éxito para establecer una expresión estable del gen en humanos (Balliet and Bates, 1998).

Los plásmidos lentivirales generados son capaces de entrar en la célula, y dirigir el gen pero no tienen la habilidad de replicarse lo que les hace muy seguros desde el punto de vista de manipulación. Los primeros vectores lentivirales se basaban en el virus de la inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1) y se dirigieron a estudios de transferencia de genes (Naldini et al., 1996).

Para aumentar el rango de actuación los plásmidos lentivirales pueden pseudotiparse, es decir incluirles glicoproteínas (GP) procedentes de la envoltura de otros virus. De este modo adquieren el tropismo de los virus de donde proceden las glicoproteínas. La GP de los vectores lentivirales de pseudotipo más ampliamente usados son los que contienen la GP del virus de la estomatitis vesicular (VSVG) (Naldini, et al. 1996; Akkina et al., 1996; Hoffman et al., 2000; Reiser et al., 1996), la cual amplía el rango de células que los viriones alcanzan (Bartz et al., 1996).

En la segunda versión del sistema, los componentes de empaquetamiento derivados del VIH-1 se redujeron a los genes *gag*, *pol*, *tat* y *rev*. En este caso, el mismo vector llevaba las secuencias necesarias para la transcripción, encapsidación, transcripción reversa e integración (Zufferey et al., 1997). La tercera generación, con una búsqueda de aplicación más clínica, sólo lleva los genes *gag*, *pol* y *env*, usando una quimera del extremo 5' RTL (repetición terminal larga) para asegurar la transcripción en ausencia del gen *tat* (Figura 13). Esta última generación representa la más usada en terapia génica (Verma and Somia, 1997).

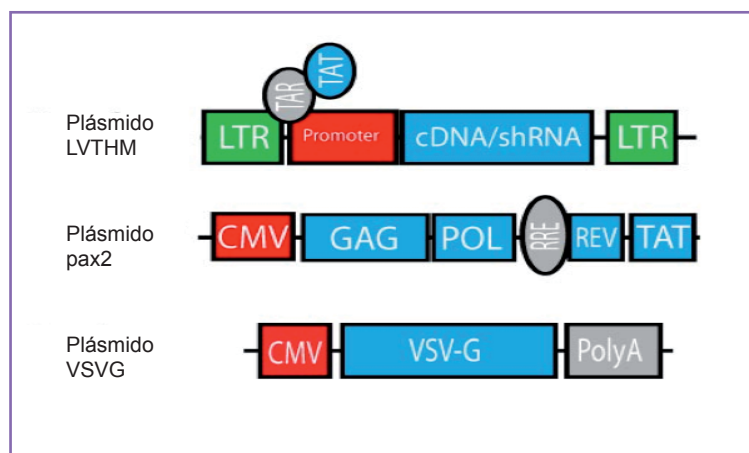


Figura 13. Esquema de los plásmidos lentivirales utilizados en este proyecto. La producción de las partículas lentivirales con pseudotipo VSVG se generan por transfección transitoria de células HEK 293T con los vectores indicados.

Los plásmidos lentivirales son generalmente producidos por transfección transitoria en células empaquetadoras HEK293T (células embrionarias humanas de riñón 293T), de tres o más plásmidos: un plásmido expresa el vector de transferencia (contiene el gen de interés, y la proteína verde fluorescente), el plásmido de empaquetado (contiene los genes retrovirales, *gag* y *pol*) y el vector que expresa la proteína de la envuelta (por ejemplo, VSVG). El gen *gag* codifica las proteínas de la matriz y la cápside del virión, y el gen *pol* codifica las enzimas, proteasa, transcriptasa inversa e integrasa, necesaria para la integración del ARN de doble cadena en la célula hospedadora. El uso de las células HEK293T asegura además una producción a gran escala altos títulos de partículas virales (Gasmi et al., 1999).

OBJETIVOS

- 1. Diseño de una metodología basada en el uso de un biosensor óptico para la detección de ligando mediante inmovilización de su receptor**
 - a. Generación de partículas lentivirales en células que expresen el receptor de interés y posterior caracterización
- 2. Puesta a punto del método para detectar la interacción CXCL12 - CXCR4 mediante un sistema basado en la resonancia de plasmón superficial**
 - a. Inmovilización de las partículas lentivirales en un biosensor
 - b. Determinar la especificidad de la unión quimioquina-receptor
 - c. Regeneración, reproducibilidad y reusabilidad del sistema
- 3. Desarrollo del sistema SPR - partícula lentiviral**
 - a. Detección de CXCL12 en muestras de orina de pacientes con artritis reumatoide
 - b. Cálculo de los parámetros cinéticos que rigen la unión de CXCL12 a su receptor CXCR4
 - c. Efecto de moléculas que pueden alterar la unión de CXCL12 a CXCR4

MATERIALES Y MÉTODOS

1. LÍNEAS CELULARES

La línea celular HEK293T Italy son células embrionarias de riñón humano (ATCC CRL-11268); la línea HT-29, células de carcinoma de colon humano (HTB-38) y la línea celular HeLa, células de adenoma cervical humano (CCL-2), fueron obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, USA). Para mantenerlas en cultivo utilizamos DMEM (Biowhittaker, USA), suplementado con 10% de suero de ternera fetal (FCS) (GIBCO), 2mM de L-Glutamina y 1 mM de piruvato sódico (medio suplementado) a 37 °C con un 5% de CO₂.

2. ANTICUERPOS Y QUIMIOQUINAS

Los anticuerpos empleados frente al CXCR4 son anti-CXCR4-01 generado en nuestro laboratorio (IgM) (Vila-Coro et al., 1999); anti-CXCR4 (12G5; IgG) y anti-CXCR4 biotina (12G5, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Los anticuerpos monoclonales frente a proteínas estructurales de las partículas lentivirales, anti-p24 y anti-VSVG (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Anticuerpos frente a glicoproteínas, como son el anti-sindecano-4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); anti-CD44-PE (BD Biosciences, San Diego, CA, USA); y anti-CD9 (VJ1/20) monoclonal (cedido amablemente por el Dr. Francisco Sánchez-Madrid, Hospital de la Princesa, Madrid, España). Anticuerpos usados para citometría de flujo, Avidina-PeCy7 (BD Biosciences) y anti-inmunoglobulinas G (H+L) de ratón marcadas con SPRD (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA).

Las quimioquinas usadas CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α) y CXCL12 (SDF-1 α), fueron obtenidas de *Peppo Tech* (Rocky Hill, NJ, USA).

3. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Las células fueron plaqueadas en una placa de 96 pocillos de fondo en “V” (3 x 10⁵ células/pocillo), e incubadas con los correspondientes anticuerpos monoclonales diluidos en PBS [137mM NaCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,76 KH₂PO₄, 2,7 mM KCl, pH 7,4], que además contiene 0,5% de suero fetal bovino, 1% de albúmina de suero bovino (BSA) y 0,025% de azida sódica, se denomina PBS de tinción. Tras incubar (30 – 45 min., 4°C), lavamos las células dos veces con el PBS de tinción e incubamos con los correspondientes anticuerpos secundarios (30 min., 4°C), diluidos en el mismo tampón. Después de esta incubación lavamos las células 2 veces con PBS de

tinción y las resuspendemos en PBS para su análisis en el citómetro de flujo Profile XL (Beckman coulter, Miami, FL). Como controles negativos usamos anticuerpos monoclonales del mismo isotipo dirigidos contra antígenos no relacionados.

4. INMUNOFLUORESCENCIA

Las células adherentes (HEK293T, HT29 o HeLa) se sembraron en los cristales 24 h antes de realizar la tinción (5×10^4 células/cristal), previamente tapizados con poli-L-Lisina (20 $\mu\text{g/ml}$, 1 h, 37°C; Sigma-Aldrich). Las células se lavaron con PBS frío y se fijaron con paraformaldehído al 4% (3 min., TA, temperatura ambiente). Para evitar uniones inespecíficas se trataron con PBS suplementado con 1% BSA, 0,1% suero cabra, 10% suero ratón y 150 mM de NaCl (1 h, 37°C). Entonces, se marcaron con el anticuerpo monoclonal sindecano-4 (0,5 $\mu\text{g}/10^6$ células, 30 min., TA), seguido de un anticuerpo secundario de ratón IgG marcado con Alexa 488 (Invitrogen). Como anticuerpo control usamos, un anticuerpo monoclonal anti-CD9 (Longo et al., 2001), seguido de un anti IgG de ratón marcado en Cy3 (555 - 655 nm). Las inmunofluorescencias fueron evaluadas mediante un microscopio confocal invertido, Zeiss Axiovert LSM 510-META usando el objetivo 63x con aceite de inmersión (apertura numérica 1:40) y procesamos las imágenes usando el programa ImageJ (1.43 *software*).

Todas estas inmunofluorescencias requieren de una serie de controles negativos, para asegurarnos que la tinción es específica y que no es debida a posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos secundarios.

5. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PARTÍCULAS LENTIVIRALES

La generación de las partículas lentivirales se lleva a cabo transfectando células HEK293T con los vectores: pLVTHM, pPAX2 y pVSVG, a la misma concentración. La transfección se realiza usando JetPEI™ (*Polyplus-transfection*) con un cambio de medio a las 6 h. Después de 72 h post-transfección, se recoge el sobrenadante y centrifuga (30 min., 3.000 rpm, revoluciones por minuto). Posteriormente, se ultracentrifugan en un rotor SW55 Beckman (2 h, 4 °C, 26.000 rpm) sobre un colchón de sacarosa del 20%, para concentrar y resuspender el pellet viral en PBS 1x. Se realiza una segunda ultracentrifugación, en el caso que fuera necesario obtener partículas virales más purificadas, a través de un gradiente de sacarosa 20-50%, en un rotor SW41 Beckman (45 min., 4°C, 37.000 rpm). Se recogen fracciones de 1 ml, de cada una de ellas se recogen 10 μl y se transducen las células HEK293T (5×10^4 células/pocillo) previamente plaqueadas. Después de 48 h, las células se levantan y se testan por citometría de flujo. La fracción que presente las partículas se vuelve a ultracentrifugar (1 h, 4°C, 26.000 rpm) para eliminar la sacarosa y concentrar los viriones. Finalmente, estas partículas son alicuotadas y almacenadas a -80°C para posteriores análisis.

En el caso de generar partículas lentivirales con otros receptores de quimiocinas no presentes en las células HEK293T, deben transfectarse 24 h antes con el plásmido que contenga el receptor, en nuestro caso, el pCDNA3.1-CCR5. Y continuar con el protocolo explicado anteriormente.

6. TITULACIÓN DE LAS PARTÍCULAS LENTIVIRALES

Las células HEK293T (4×10^4 células/pocillo) son transducidas con diluciones seriadas (1/2) de las partículas virales, la primera dilución es 1 μ l de la alícuota concentrada en un volumen final de 250 μ l, 6 horas más tarde se añade 1 ml de medio completo. Después de 24 horas de la transducción, se cuentan las células de un pocillo (se esperan unas 8×10^4 células). Tres días más tarde se levantan las células y se analizan por citometría de flujo, donde aquellas que presentan la proteína verde fluorescente (GFP) son positivas. Se usa para el cálculo del título los valores dentro de la zona lineal (normalmente 5-10%; coeficiente de correlación, $r^2 = 0,95$). La titulación es un número de células (porcentaje) transducidas por el volumen dado y contado en el día 2 de la transducción. El valor de la titulación suele estar en el orden de 10^7 TU/ml (unidades transducidas por mililitro).

7. ACOPLAMIENTO DE LAS PARTÍCULAS LENTIVIRALES A BOLAS DE LÁTEX

Para evaluar por citometría de flujo las partículas virales, estas fueron acopladas a bolas de látex. Previamente, las bolas (4 μ m, 4% w/v; A37304, Invitrogen, Eugene, OR, USA) son sonicadas (5 min., TA) para disgregarlas, y se mezclan a ratio 1:1 (v/v) con las partículas virales (15 min., TA). A continuación, se añade 1ml de PBS y se dejan incubando (1 h, 4°C, en rotación). La reacción finaliza añadiendo glicina 100mM (30 min., TA). Finalmente, se lavan con PBS/BSA 0,5% por centrifugación (3 min., 4.000 rpm) un par de veces. Las bolas acopladas a las partículas lentivirales se resuspenden en tampón de marcaje y se realiza el análisis para citometría de flujo, siguiendo los pasos que se explicaron anteriormente para citometría de flujo.

8. WESTERN BLOT

Las células fueron lisadas en 100 μ l de tampón con detergente que contenía trietanolamina (20mM, pH 8), y 2% digitonina; se añadieron inhibidores de proteasas, aprotinina y leupeptina (20 μ g/ml, cada uno); PMSF (1 mM), y el inhibidor de fosfatasa, ortovanadato sódico (10 μ M). La lisis se lleva a cabo en agitación (30min., 4°C), e inmediatamente después se centrifugan (15 min., 4°C, 14.000 rpm). La cantidad de proteína de los extractos se cuantificó mediante Bradford en el caso de los lisados celulares con trietanolamina:digitonina. Mientras, la cantidad de proteína en las partículas virales se cuantificó mediante BCA (Pierce).

Las proteínas se separaron en geles de SDS/PAGE, con un porcentaje de acrilamida/bisacrilamida del 12%, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham Biosciences).

Estas membranas fueron bloqueadas con 5% de leche en TBS (60 min., TA, agitación). A continuación se incubaron con los anticuerpos de interés, diluidos en 2% leche en TBS (toda la noche, 4°C, agitación). A continuación, se lavaron con TBS-tween 20 (TBS-T 0,1%) y se añadieron los anticuerpos anti-inmunoglobulinas de ratón marcados con peroxidasa de rábano (HRP) (Tago, CA, USA). Finalmente, las membranas se revelaron por un método de detección de quimioluminiscencia comercial (ECL, Pierce).

9. INMUNOENSAYOS ENZIMÁTICOS

9.1. ELISA para partículas lentivirales

La presencia de receptores en las partículas virales se determinó también mediante inmunoensayos (ELISA). Tapizamos las placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) con las partículas virales (toda la noche, 4°C). A continuación, se lavaron con PBS y se bloqueó con suero de cabra en PBS/BSA 2% (1 h, 37°C), bloqueando posibles sitios de unión inespecífica. Lavamos e incubamos con el anticuerpo CXCR4-01 (1 h, 37°C), seguido de inmunoglobulinas de ratón-HRP (1 h, 37°C). Lavamos y revelamos, para lo que se usó o-fenilendiamina (OPD, Sigma-Aldrich), y la reacción se paró con ácido sulfúrico (3 N). La lectura de la fluorescencia se realizó a 492 nm usando el lector Titertek Multiskan MCC/340. Como controles negativos usamos anticuerpos monoclonales del mismo isotipo dirigidos contra antígenos no relacionados.

9.2. ELISA para CXCL12 humano

Utilizamos el kit comercial Quantikine para el CXCL12 humano (R&D Systems) siguiendo las instrucciones del fabricante. El linealidad de la detección está entre 0,312 pg/ml y 10 ng/ml para el CXCL12.

10. DETECCIÓN POR INMUNO-ORO DE RECEPTORES EN PARTÍCULAS LENTIVIRALES

Las partículas lentivirales fueron examinadas por tinción negativa mediante microscopía electrónica de transmisión. Una gota de la suspensión de partículas lentivirales se coloca sobre papel parafinado (Parafilm) y luego una rejilla de oro, previamente recubierta con una película de “Forvard” y se deja flotar sobre la gota (5 min.). El exceso de líquido se retira colocando papel de filtro en los bordes. Posteriormente, con la misma técnica de la gota en el papel, se incubaba la rejilla con el anticuerpo CXCR4-01 (30 µg/ml, 15 min., TA); seguido de un anticuerpo (IgG + IgM) conjugado con oro de 10 nm (15 min., TA; British Biocell, UK). Posteriormente se realiza la tinción negativa con una solución de acetato de uranilo al 2% (30 s, TA). Las rejillas se observan en un microscopio electrónico de transmisión a 100kV (1200-EX II; Jeol, Tokio, Japón).

11. CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE RECEPTORES EN LAS PARTÍCULAS VIRALES

Las células HEK293T se co-transfectaron con los vectores virales, como se indicó previamente, en DMEM suplementado (24 h, 37°C). Las células se lavaron con DMEM libre de metionina y se incubaron en medio suplementado con Metionina-S³⁵ (50 µCi/ml, 48 h, 37 °C, 5% CO₂). A continuación, las partículas lentivirales marcadas con Metionina-S³⁵ se recogen y purifican como se explicó anteriormente, realizando en este caso las dos ultracentrifugaciones. Las partículas purificadas se usaron para hacer diluciones seriadas (1/2) que se cargaron en un gel de poliacrilamida al 12%, el cual se resolvió por SDS/PAGE, y se secó en papel de filtro (*Whatmann*) para posteriormente visualizarlo. La exposición del gel se realizó en un fosfoimager (Storm 869, Molecular Dynamics). La estequiometría relativa del CXCR4 en las partículas virales se calculó usando el programa *Quantity One* (BioRad, CA, USA).

12. BIOSENSORES ÓPTICOS

Hemos empleado dos biosensores en este trabajo, un biosensor experimental, y un biosensor comercial llamado Biacore 3000 (GE Healthcare), ambos son biosensores ópticos que usan la configuración de la resonancia de plasmón superficial (Figura 14).

12.1. Biosensor experimental

Este sensor presenta dos canales separados (2 mm diámetro), cuyo volumen es de 300 nl cada uno, y permite dos medidas independientes. Este aparato consta de un láser diodo de 3 mV que opera a 670 nm. Los cambios en la intensidad de luz reflectada indican cambios de masa en la superficie detectados por un fotodiodo, que amplifica y convierte la señal en digital. Para obtener una continua monitorización de las uniones, todas las medidas son tomadas con un ángulo de incidencia fijo.

Las muestras son inyectadas en el biosensor usando un sistema de flujo impulsado por una bomba a una velocidad determinada (20 – 60 µl/min.), la cual puede ser modificada dependiendo del ensayo. La inyección es de un volumen constante de 370 µl, que se introduce en el flujo continuo del sensor. Un ciclo completo de medida, incluyendo inyección de la muestra y regeneración, es de mínimo 12 min. a una velocidad de 60 µl/min. La unidad de medida de este aparato son unidades arbitrarias (u.a.) de señal SPR.

12.2. Biosensor comercial

Biacore 3000 es un instrumento que usa la tecnología SPR para medir las interacciones entre moléculas. Puede ser usado para la medida de las constantes de afinidad y entre otras aplicaciones. Presenta un sistema de cuatro canales en la superficie del sensor, con un sistema microfluídico que permite la interacción de la superficie del sensor con estos canales. El chip usado es el CM5 que presenta cuatro canales con una superficie de dextrano. La configuración de este sistema permite que la muestra fluya por los cuatro canales (seriado) o sólo por uno de ellos (independiente).

La unidad de medida de este sistema son las RU (unidades de resonancia). Las muestras son inyectadas en el biosensor a una velocidad determinada (30 $\mu\text{l}/\text{min.}$), la cual puede ser modificada dependiendo del ensayo. La inyección es de un volumen dependiente del tiempo de inyección (60-90 μl).

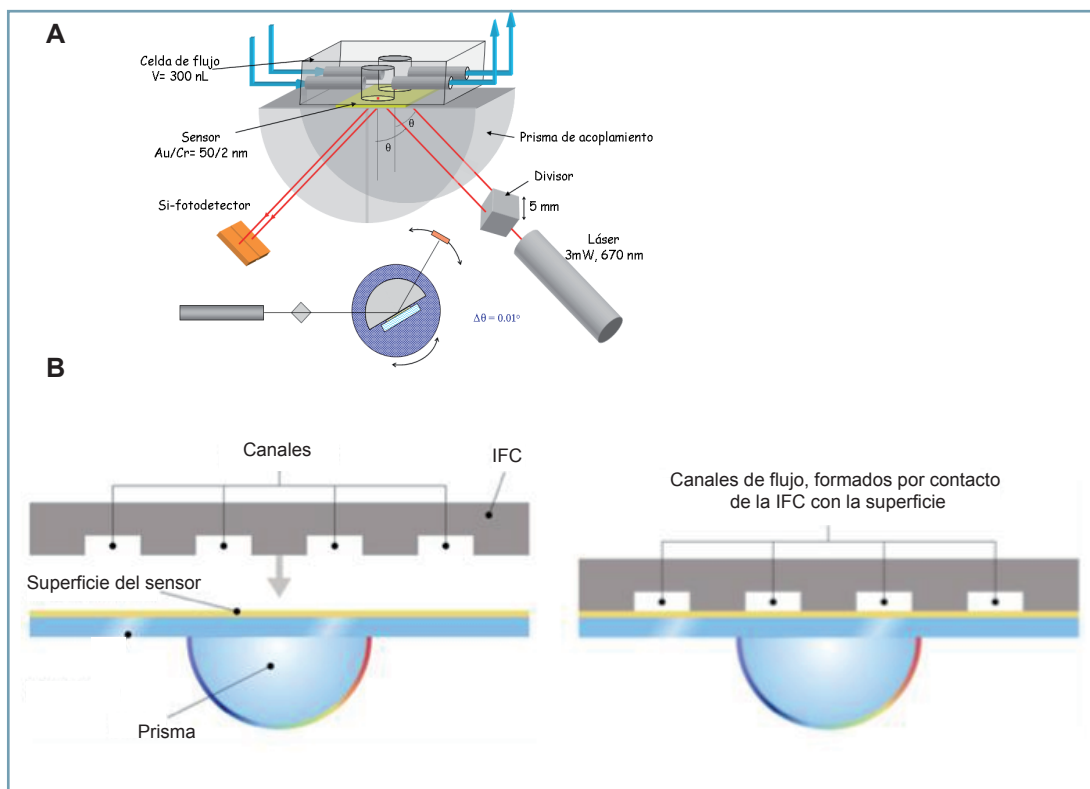


Figura 14. **Esquema de las configuraciones de los biosensores.** (A) biosensor experimental. Presenta 2 canales con dos superficies de medida. (B) Biosensor comercial. IFC (cartucho fluido integrado) consiste en una serie de canales y válvulas que contienen el líquido y lo dirigen a la superficie del chip, que está formado por 4 canales.

13. INMOVILIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES EN LA SUPERFICIE DEL BIOSENSOR EXPERIMENTAL

La superficie del chip de oro se prepara para acoplar una monocapa de alcanotiol, denominada monocapa de autoensamblaje (SAM) que permite una cubierta uniforme. Estos chips se limpian con tricloroetileno, acetona y etanol; posteriormente se sumerge en una solución de ácido sulfúrico y agua oxigenada, denominada piraña; y se limpia con agua y se seca con nitrógeno. El oro se coloca sobre los canales y se adhiere el prisma con aceite, para el cambio de índice de refracción.

A una velocidad constante (20 $\mu\text{l}/\text{min.}$) se mantiene todo el proceso de inmovilización. Primero, para la formación de la SAM se inyecta el alcanotiol, que es el ácido mercaptoundecanoico (0,05 mM) que se une por absorción, su exceso es eliminado con etanol y agua. La superficie carboxílica se activa con una mezcla de N-hidroxisuccinimida (NHS; 0,1 M) y 1-etil-3-(3dimetil-amino-propil) carbodiimida (EDC; 0,4 M) (Steinheim, Alemania), que forman un ester intermedio. A

continuación se inyecta la muestra de partículas lentivirales diluida en acetato (NaOAc 10 mM, pH 6) que se une de forma covalente vía grupos amino. Finalmente, la superficie es bloqueada con etanolamina (1 M, pH 8,5). Una vez se termina la inmovilización se deja un flujo continuo (60 μ l/min.) de PBS-T 0,05 % (pH 7,4; T= tween 20, surfactante para disminuir señales inespecíficas).

Los analitos usados en los experimentos se pasaron a una velocidad constante (60 μ l/min.), los tiempos de la fase de asociación y disociación difieren dependiendo de la muestra. Todos los anticuerpos y quimioquinas analizados fueron diluidos en PBS-T, y la fase de asociación fue de unos 7 min. para la estabilización. En el caso de emplear el inhibidor AMD3100, este se añadió al tampón de flujo continuo (PBS-T) y en las muestras, a una concentración de 100 μ M. Las muestras de orina usadas necesitaron una fase de asociación más prolongada (10 min.) para que obtener una señal estable. La regeneración de la superficie se realizó con 5 mM de HCl en todos los casos.

14. INMOVILIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES EN BIACORE

En este caso se usa un chip comercial CM5 (GE Healthcare) que presenta una matriz de dextrano carboximetilado ensamblado covalentemente a una superficie de oro. Las moléculas van a acoplarse covalentemente a la superficie del sensor vía grupos amino. Al igual que en el otro biosensor, se usa una mezcla de NHS (0,1 M) y EDC (0,4 M) para activar la superficie del chip (5 μ l/min., 7 min., 25°C). Como flujo continuo se usa el tampón HBS-P [10 mM Hepes, 0,15 M NaCl, 0,005% polioxietilen sorbitan P20, (surfactante comercial para disminuir señales inespecíficas y estabilizar la señal), a pH 7,4]. Todos los tampones son desgasificados y filtrados por un filtro de 0,22 μ m. Las partículas lentivirales se diluyeron en tampón acetato (10 mM, pH 4) y se inyectaron sobre la superficie (5 μ l/min., 5 min., 25°C), seguidamente la etanolamina (1 M, pH 8,5 a 5 μ l/min., 7 min., 25°C), para bloquear todos los sitios de unión inespecífica. Decidimos llevar a cabo nuestros experimentos de cinética inmovilizando \sim 6.000 RU de partículas lentivirales.

15. ANÁLISIS CINÉTICO EN BIACORE

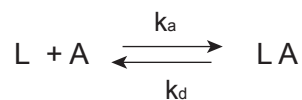
El tampón de flujo continuo es el PBS-P (0,005%) a una velocidad constante (30 μ l/min.). Las muestras de CXCL12 fueron diluidas en PBS-P e inyectadas sobre la superficie del sensor a una velocidad constante (30 μ l/min.), donde la fase de asociación (3 min.) va seguida de la fase de disociación (5 min.) en PBS-P. La superficie se regenera con una inyección de 5mM HCl para que vuelva a ser usada. Los sensorgramas son corregidos substrayendo la señal obtenida en el canal vacío, es decir, este canal se activa y desactiva sin unir viriones. Todos los pasos son llevados a cabo por un sistema automático robotizado, y se siguen en tiempo real para visualizar cualquier cambio en RU del índice de refracción. Las curvas derivadas de estos ensayos son usadas para el cálculo de las constantes cinéticas y la constante de afinidad.

Cuando fue requerido, el ligando CXCL12 fue preincubado con diferentes GAG [Heparan sulfato (H7640), heparina (B9806), condroitin sulfato (C9819); (Sigma-Aldrich)] a concentraciones

determinadas (30 min., 37°C), y se inyectaron los complejos igual que el CXCL12 sólo. Las señales se corrigieron, en este caso, substrayendo la señal del CXCL12 sólo, del GAG correspondiente sólo, y del canal de referencia como previamente. Las curvas obtenidas fueron usadas para el cálculo de las constantes. El análisis de los sensorgramas se hicieron siguiendo los ajustes según el modelo de *Langmuir* de interacción 1:1 (*Biaevaluation 4.1 software*).

Modelo simultáneo para k_a y k_d (*Langmuir* 1:1)

k_a Constante de asociación



k_d Constante de disociación

K_D Constante de afinidad

$$K_A = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[LA]}{[A] \times [L]} \quad \text{Constante de asociación en equilibrio (M}^{-1}\text{)}$$

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[A] \times [L]}{[LA]} \quad \text{Constante de disociación en equilibrio (M)}$$

$$R_{eq} = \frac{(k_a \times \text{Conc} \times R_{max})}{(k_a \times \text{Conc} + k_d)} \quad \text{Nivel de unión en estado estacionario}$$

16. MUESTRAS DE ORINA

Las orinas proceden de pacientes con artritis reumatoide y como control donantes sanos. Las muestras proceden del hospital Puerta de Hierro de Majadahonda, donde se almacenaron a -20°C. La media de edad de los individuos es de 45 años (rango 35 y 55 años). Todos los participantes estudiados dieron su consentimiento.

17. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los niveles de significatividad estadística son calculados por *Student's t* test y aplicando ecuaciones de regresión no lineal según el modelo *Mann-Whitney* con un 95% de intervalo de confianza (*GraphPad Prism 5.0 software*).

RESULTADOS

1. ANÁLISIS DE LOS RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS USANDO PARTÍCULAS LENTIVIRALES

1.1. Generación de partículas lentivirales que presenten el receptor CXCR4

Las células HEK293T expresan endógenamente en su superficie el receptor de quimioquinas CXCR4, tal y como comprobamos mediante ensayos de citometría de flujo a través de un marcaje con un anticuerpo específico (Figura 15A). Por lo que, estas células fueron usadas como fuente para la generación de partículas lentivirales. Para ello, co-transfectamos las células transitoriamente con los vectores lentivirales, pLVTHM, pPAX2 y pVSVG, que contienen los genes necesarios para la formación y empaquetamiento de las partículas virales (Figura 16). Después de 72 horas, recogimos los sobrenadantes y purificamos las partículas lentivirales por ultracentrifugación sobre un colchón de sacarosa al 20%. Las partículas lentivirales concentradas se resuspendieron en PBS para alicuotarse y proceder así a titular los viriones.

La eficiencia de la transfección puede conocerse gracias a que el plásmido LVTHM incluye la proteína verde fluorescente (GFP). De ese modo detectamos en paralelo en las células HEK293T por citometría de flujo (Figura 15B) o por microscopía de fluorescencia (Figura 15C) la GFP, y observamos que alrededor de un 90% de las células resultan transfectadas.

Para la titulación de los viriones, transducimos células HEK293T con las partículas obtenidas haciendo diluciones seriadas. De nuevo aprovechando que la transducción con las partículas lentivirales incluye la expresión de la GFP en las células, es muy sencillo su evaluación por citometría de flujo (Figura 15D), y así homogeneizar los diferentes lotes de partículas virales a un título aproximado de 10^7 TU/ml.

1.2. Detección de la presencia del CXCR4 en las partículas lentivirales

El siguiente paso de caracterización del sistema consistió en confirmar la presencia del CXCR4 en la superficie de la partícula lentiviral. Puesto que el tamaño de la partícula viral (50-100 nm) (Figura 17A) imposibilita su detección directa por citometría de flujo pusimos a punto el acoplamiento de las partículas lentivirales a bolas de látex; y aprovechando la presencia de la GFP en ellas, evaluamos su detectabilidad por citometría. Confirmado que las partículas asociadas a bolas de látex pueden ser detectadas, realizamos en esas condiciones el marcaje con anticuerpos específicos para CXCR4, usando como control un anticuerpo del mismo isotipo (Figura 17B). El estudio por citometría de flujo demostró la expresión del receptor CXCR4 en la superficie de las partículas lentivirales, que a partir de ahora llamaremos PLVX4.

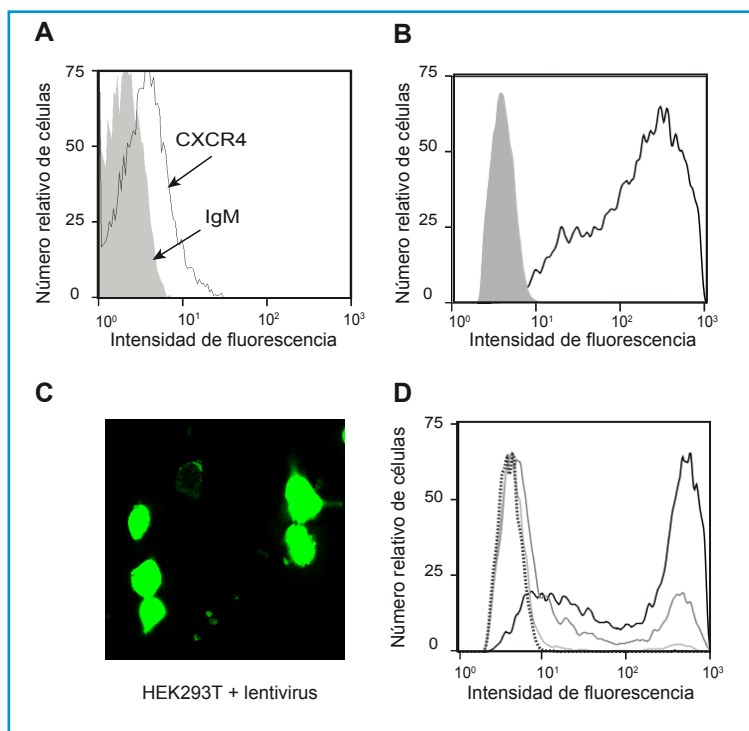


Figura 15. **Expresión endógena de CXCR4 y transfección en las HEK293T de las partículas lentivirales.** (A) Expresión en la membrana de las HEK293T del receptor CXCR4 mediante citometría de flujo usando el anti-CXCR4 (12G5) (línea negra) y el control de isotipo (gris). (B) Porcentaje de transfección de los vectores lentivirales en las HEK293T (línea negra) por citometría de flujo gracias a la proteína verde fluorescente (GFP) expresada por el plásmido pLVTHM. Control de las células sin transfectar en color gris. (C) Imagen de microscopía de fluorescencia de las células HEK293T transfectadas con los vectores lentivirales se encuentra la expresión de GFP presente en el vector viral pLVTHM. (D) Transducción de las partículas lentivirales PLVX4 en las HEK293T, analizadas por citometría de flujo para el cálculo del título viral.

Los resultados fueron también confirmados mediante Western Blot. En este caso, usamos un lisado de las PLVX4 y otro de las células HEK293T como control positivo. Y analizamos la membrana con un anticuerpo específico para CXCR4 (Figura 17C). Como control de la presencia de las partículas lentivirales también evaluamos la membrana con anticuerpos específicos de las proteínas estructurales del virión, VSVG y p24. Como era de esperar, mientras CXCR4 se detectó en los carriles de células y partículas virales, VSVG y p24 sólo estaban presentes en las partículas lentivirales (Figura 17C).

Dado que la presencia de CXCR4 en las partículas lentivirales es un punto crítico del proyecto, todavía realizamos una confirmación más utilizando un ELISA. Una vez tapizada la placa con las PLVX4, las incubamos con un anticuerpo específico frente al CXCR4 o con un control de isotipo. De nuevo, sólo observamos unión del anti-CXCR4 en aquellos pocillos que presentaban las PLVX4 (Figura 18A). Aunque todos estos datos confirman la expresión del receptor CXCR4 en las partículas lentivirales, realizamos una tinción negativa de las partículas con anti-CXCR4 unido a bolas de oro 10 nm por microscopía electrónica de transmisión (Figura 18B). El resultado de nuevo confirmó la presencia del receptor CXCR4 en la superficie de la partícula lentiviral.

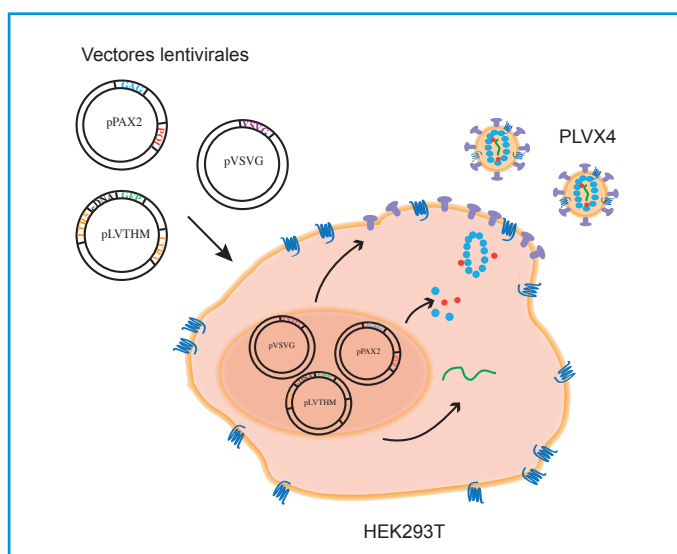


Figura 16. **Esquema de la generación de partículas lentivirales.** Los tres vectores lentivirales (pPax2, pVSVG y pLVTHM) presentan los genes necesarios para la generación de las partículas lentivirales en el interior de las células HEK293T. En su salida arrastran parte de la membrana plasmática con ellas, incluyendo las proteínas, como CXCR4, que contienen.

1.3. Cálculo del nivel de expresión de CXCR4 en las PLVX4

La detección de CXCL12 mediante el CXCR4 presente en las partículas lentivirales depende directamente de los niveles del receptor. Para determinar este nivel de expresión de CXCR4 en las PLVX4, co-transfectamos las células HEK293T con los plásmidos lentivirales como hicimos anteriormente aunque en este caso suplementamos el medio de cultivo con Metionina-S³⁵. Tras 72 horas, las PLVX4 fueron purificadas mediante dos ultracentrifugaciones, la primera sobre un colchón de sacarosa al 20%, y la segunda en un gradiente de sacarosa del 20 - 50%, para eliminar toda la suciedad presente en el sobrenadante celular. De esta forma teníamos un pellet de viriones purificados que titulamos según antes se mencionó. Cargamos en gel de poliacrilamida (12%) diluciones seriadas de las partículas y se resolvió por SDS-PAGE. Estos resultados fueron confirmados por Western Blot con anticuerpos frente a CXCR4, VSVG y p24 (Figura 18C). A

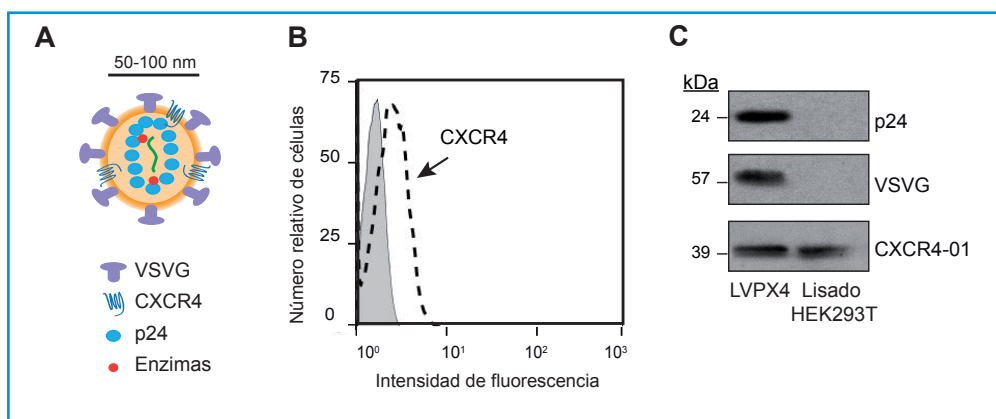


Figura 17. **Expresión de CXCR4 en las partículas lentivirales.** (A) Esquema de la partícula lentiviral con el receptor CXCR4 y VSVG en la superficie, p24 forma la cápside y las enzimas: proteasa, transcriptasa inversa, ARNasa e integrasa en el interior junto con el ARN. (B) Expresión de CXCR4 en la superficie de las partículas mediante bolas de látex acopladas a las PLVX4, por citometría de flujo usando un anticuerpo específico frente al CXCR4 (12G5) (línea punteada), y control especificidad un anticuerpo del mismo isotipo (gris). Experimento representativo de al menos cinco realizados. (C) Extractos de las PLVX4 y las células HEK293T se analizaron por Western Blot con anticuerpos frente CXCR4, p24 y VSVG.

la vez cuantificamos el marcaje con Metionina- S^{35} de cada banda. Como se conoce el número de p24 que presentan los lentivirus, y el número de residuos de metionina (11 y 6 para p24 y CXCR4, respectivamente), pudimos calcular el número relativo de moléculas de CXCR4. De este modo confirmamos que el número de moléculas de CXCR4 incorporadas a la envuelta viral corresponde a un 10% del número de monómeros de proteínas p24 en la estructura central del virus. Es decir, asumiendo que hay ~ 2.100 moléculas p24 /partícula (Briggs et al., 2003), la superficie de nuestras partículas purificadas contiene una media de 210 ± 18 moléculas de CXCR4.

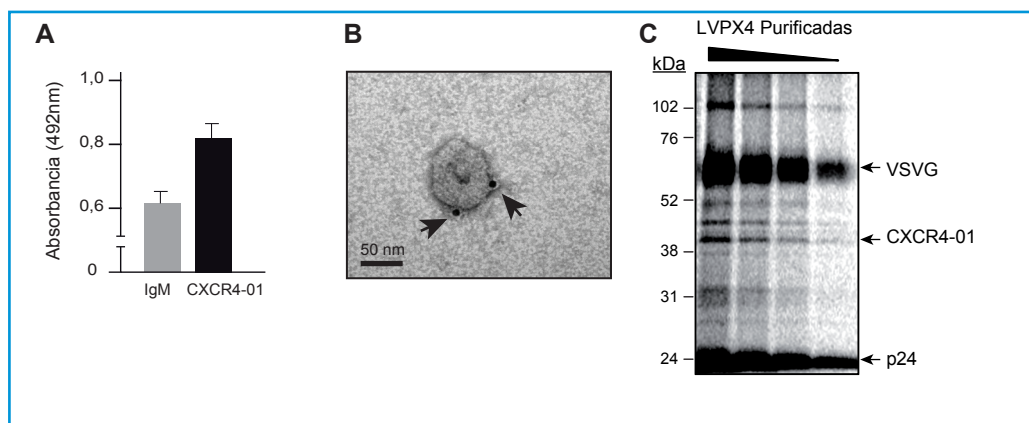


Figura 18. **Expresión y cálculo de CXCR4 en las partículas PLVX4.** (A) Reconocimiento de CXCR4 en los viriones por ELISA con anticuerpo frente al CXCR4 usando las PLVX4 acopladas a la placa, y como control usamos un anticuerpo con el mismo isotipo. (B) Micrografía por microscopía electrónica de transmisión de las PLVX4 marcadas con un anticuerpo primario frente a CXCR4 y un anticuerpo secundario conjugado con oro de 10 nm (IgG+IgM). La barra de escala es igual a 50 nm. (C) Estimación del número de moléculas de CXCR4 en las PLVX4 purificadas. Gel SDS-PAGE y autorradiografía de las diluciones seriadas de las PLVX4 marcadas con Met- S^{35} muestran las proteínas analizadas por WB. Experimento representativo de tres realizados.

1.4. Generación de partículas lentivirales que presenten otros receptores de quimioquinas, por ejemplo el CCR5

De modo similar preparamos partículas virales que presentasen en su superficie el CCR5, otro receptor de quimioquinas que une CCL3, CCL4 y CCL5 (Neote et al. 1993). Para ello, transfectamos transitoriamente células HEK293T con el plásmido pCDNA3.1-CCR5, y comprobamos la expresión del receptor mediante citometría de flujo usando un anticuerpo específico (Figura 19A) y por inmunofluorescencia (Figura 19B). Tras 24 h en cultivo las células se co-transfectaron con los vectores lentivirales pLVTHM, pPAX2 y pVSVG; y a las 72 h se recogieron los sobrenadantes y las partículas lentivirales se purificaron mediante ultracentrifugación como se ha descrito antes.

Las partículas purificadas, PLVR5, fueron también tituladas para homogeneizar los lotes, manteniendo un título de 10^7 TU/ml (Figura 19C). Y en este caso analizamos la presencia del CCR5 por Western Blot usando el lisado de células HEK293T transfectadas con CCR5 como control positivo, y anticuerpos específicos de CCR5 y CXCR4 (Figura 19D).

2. ESTUDIO DEL RECEPTOR CXCR4 A TRAVÉS DE LA RESONANCIA DE PLASMÓN SUPERFICIAL

2.1. Condiciones de inmovilización de las PLVX4 en el biosensor experimental

Una vez demostrado que las partículas lentivirales presentaban el CXCR4 en su superficie y cuantificado el número de receptores presentes, pasamos a inmovilizar las partículas en la superficie de oro del biosensor óptico. Comenzamos con un biosensor experimental que dispone de un chip de oro vacío (superficie 2 mm²). En primer lugar, preparamos la superficie generando una monocapa de autoensamblaje (SAM) con alcanotioles de 11 átomos de carbono que terminan en grupos carboxilo, sobre los cuales utilizando la química del EDC y NHS, unimos covalentemente los viriones mediante un acoplamiento amino (Figura 20A). El mecanismo de reacción de los grupos carboxilo de la SAM con el EDC implica la formación de un intermedio O-acilisourea, que posteriormente dará lugar a un éster activo de NHS, y la sustitución nucleofílica con un grupo amino, generalmente con los grupos ε-amino de las lisinas de las proteínas (Grabarek and Gergely, 1990). La activación de la superficie con EDC/NHS se ve favorecida a pH superiores al

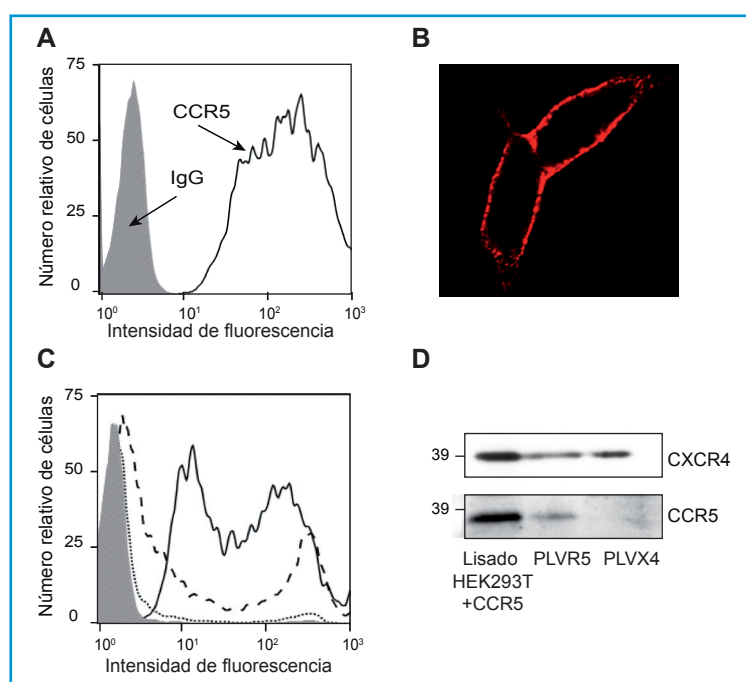


Figura 19. **Expresión de CCR5 y transfección de los plásmidos lentivirales en las HEK293T.** (A) Expresión en la membrana de las HEK293T del receptor CCR5 mediante citometría de flujo usando el anticuerpo anti-CCR5 (línea negra) y el control de isotipo (gris). (B) Imagen de microscopía confocal de las células HEK293T transfectadas con CCR5 y marcadas con un anticuerpo frente a CCR5 (magnificación 40x). (C) Transducción de las partículas lentivirales PLVR5 en las HEK293T, analizadas por citometría de flujo gracias a la proteína GFP para el cálculo del título viral. (D) Extractos de las partículas PLVR5, PLVX4 y las células HEK293T transfectadas con CCR5, analizados por Western Blot con anticuerpos frente CCR5 y CXCR4.

pKa de la monocapa ya que en estas condiciones hay una mayor proporción de grupos carboxilo desprotonados (Johnsson et al., 1991). Por esta razón inicialmente evaluamos el pH de la solución que mejor absorción de las partículas permitía. Inyectamos distintas soluciones de PLVX4 en acetato a pH comprendidos entre 4 y 6,5 en el sensor con la monocapa pero sin activar (Figura 20B). Observándose que cuando las partículas estaban a un pH ligeramente por debajo del punto isoeléctrico, están cargadas positivamente y son mejor absorbidas a la superficie del sensor. En nuestro caso usamos tampón acetato a pH 6. Posteriormente, sobre los dos canales activamos la superficie con el EDC/NHS e inyectamos (5 μ l/min.) una concentración saturante de PLVX4 sobre el sensor (3×10^5 TU/ml; $\Delta \approx 16$, señal SPR). Finalmente bloqueamos los grupos carboxilo que pudieran quedar activos inyectando una solución de etanolamina (Figura 20C).

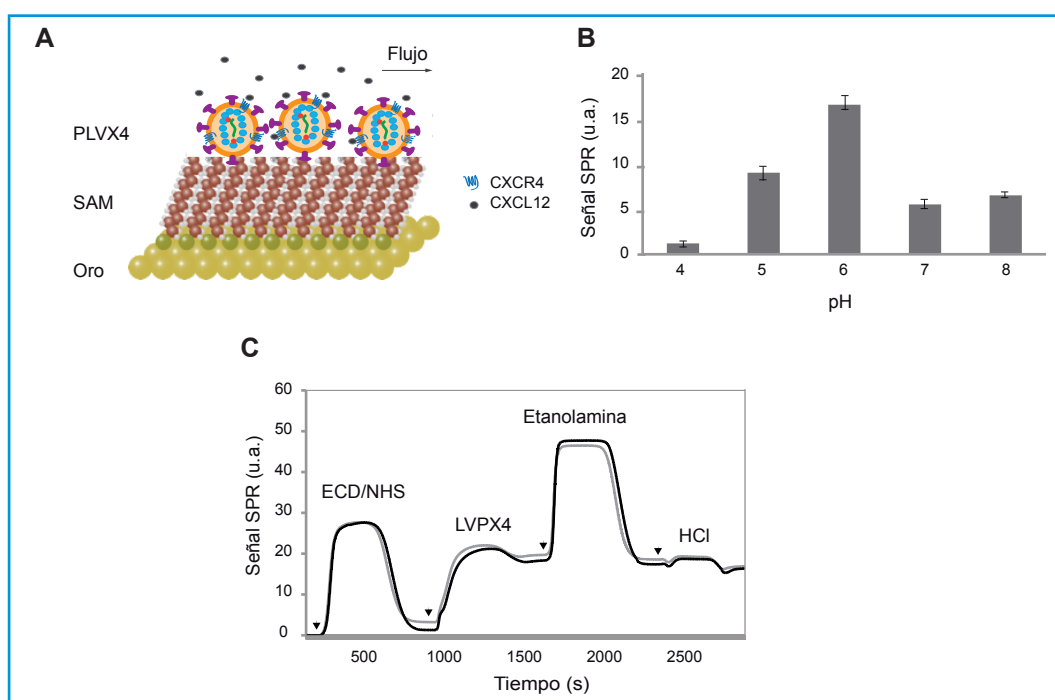


Figura 20. **Inmovilización de las partículas lentivirales en el biosensor experimental.** (A) Esquema de la monocapa de autoensamblaje (SAM) de alcanotioles en la superficie de oro del sensor, y las partículas virales acopladas covalentemente vía grupos amino. En el tampón de flujo continuo (PBS-T) se inyectan los ligandos, la flecha indica la dirección del flujo. (B) Señales SPR producidas por la inmovilización de las PLVX4 a la superficie de oro sin activación del sensor usando un rango de diluciones en acetato a pH de 4 a 8 (media \pm SEM). Un experimento representativo de cuatro realizados. (C) Sensorgrama representativo de la inmovilización en el momento que se producen las inyecciones de las PLVX4 en la superficie activada con EDC/NHS y bloqueada con etanolamina ($\Delta = 16$ u.a.; ~ 300.000 TU/ml). El sensorgrama representa las dos superficies de inmovilización. Las flechas indican las inyecciones. Señal SPR en unidades arbitrarias (u.a.) y tiempo en segundos (s).

2.2. Especificidad de las PLVX4 en el biosensor experimental

Depositadas las partículas PLVX4 sobre la superficie de oro del sensor evaluamos de forma directa la presencia de CXCR4 en su superficie inyectando un anticuerpo específico frente a CXCR4 (1 y 10 μ g/ml, 6 min., 60 μ l/min.), el cual promovió un claro incremento en el índice de refracción proporcionando una señal SPR proporcional a la concentración inyectada (Figura 21A). Como control de especificidad inyectamos otro anticuerpo de igual isotipo, observando que la señal no variaba (Figura 21A). Seguidamente y para determinar si el CXCR4 presente

mantenía su capacidad de unir ligando inyectamos CXCL12, y estudiamos la influencia de las condiciones del tampón como son el pH (6,5 - 8) y la fuerza iónica (130 - 500 mM NaCl), aspectos importantes para obtener la mejor relación entre señal específica y ruido. Estas condiciones testadas con la quimioquina CXCL12 demostraron que el tampón óptimo era PBS-T en un rango de pH entre 7 y 7,5 (Figura 21B), con una fuerza iónica menor de 200 mM. El tampón que finalmente seleccionamos fue PBS-T (0,05%, 137mM de NaCl pH 7,4).

En esas condiciones la inyección de CXCL12 (30 nM, 6 min., 60 μ l/min.) promovió un cambio en la señal SPR (señal de 0,7 u.a.) (Figura 21A). Y para demostrar la especificidad inyectamos otras quimioquinas que no interaccionan con el CXCR4, por ejemplo CCL3 (30 nM, 6 min., 60 μ l/min.), sin observar ningún cambio en el índice de refracción, es decir, el CXCR4 presente en las partículas virales es activo y capaz de unir CXCL12 (Figura 21A). Para añadir otra evidencia de especificidad tratamos las partículas virales con AMD3100, antagonista específico del CXCR4 (Hatse et al., 2002). En este ensayo, el AMD3100 (100 μ M) se mantuvo en el flujo continuo y durante toda la inyección de CXCL12. El uso del inhibidor redujo la señal promovida por el CXCL12 (80% disminución para 20 nM de CXCL12) (Figura 21E), indicando que las PLVX4 inmovilizadas sobre el sensor presentan en su superficie el receptor CXCR4, que su orientación y disposición es correcta y activa, al ser capaz de unir el CXCL12 de forma específica.

Con estas condiciones inyectamos concentraciones crecientes del CXCL12 (5 - 80 nM) sobre la superficie del sensor (Figura 21C), y pudimos observar incrementos de la señal SPR lineales hasta 40nM (de 0,1 - 1,2 u.a.), llegando a saturación con 80 nM (Figura 21D).

2.3. Regeneración de la superficie del sensor

La reutilización del sensor exige la retirada de todas las proteínas unidas sobre la superficie de las partículas lentivirales. Ello implica la disociación completa de los complejos sin dañar la superficie de las partículas. Para ello inyectamos disoluciones con diferente pH, y de distinta fuerza iónica (5 - 100mM HCl, 5 mM NaOH, 1M NaCl, ácido acético). La mejor regeneración se consiguió al inyectar 5 mM de HCl, y por ello fue la utilizada en el resto de los experimentos (no mostrado).

2.4. Reproducibilidad y reusabilidad de la superficie

El siguiente paso consistió en evaluar la reproducibilidad de la técnica y las veces que la superficie puede ser regenerada y reutilizada. Para ello estudiamos las partículas lentivirales inmovilizadas a un mismo chip durante varios días, y también las variaciones entre chips con inmovilizaciones procedentes de distintos lotes de partículas lentivirales. Se midieron muestras por triplicado con concentraciones crecientes (5, 10, 20, 30 y 40 nM) de CXCL12 en PBS-T, del mismo modo se operó sobre chips donde se depositaron distintos lotes de partículas virales. La tabla 2 muestra los coeficientes de variación obtenidos. Los valores medios para la variación de intra-inmovilización fueron menores del 8% calculando la desviación estándar relativa (RSD %).

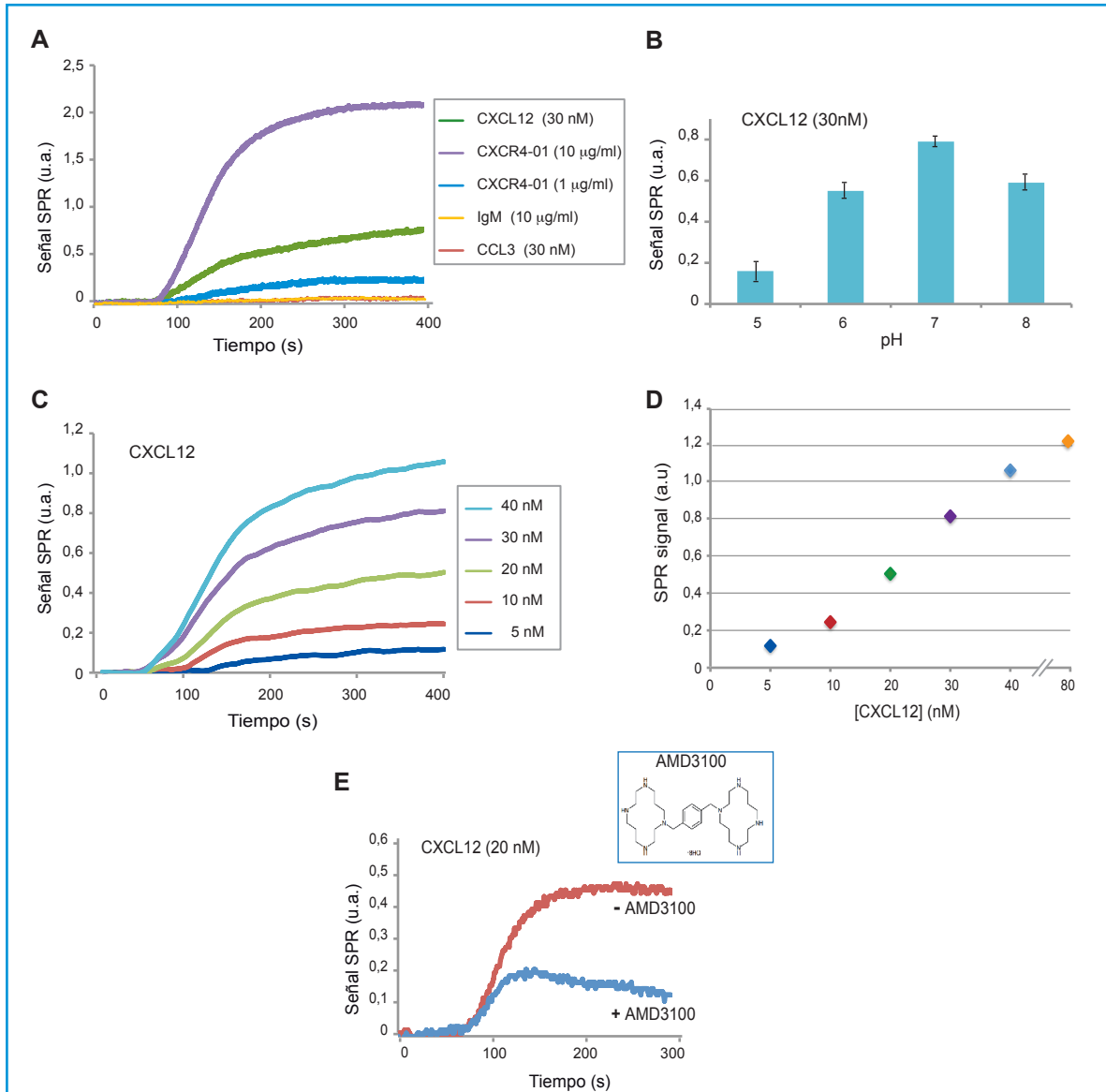


Figura 21. Unión específica de CXCL12 a las PLVX4 inmovilizadas en la superficie de oro en el biosensor experimental. (A) Sensorgrama producido tras la inyección del anticuerpo frente al receptor de CXCR4 (1 y 10 µg/ml), control de isotipo IgM (10 µg/ml), y las quimioquinas CXCL12 y CCL3 (40 nM). Un experimento representativo de cuatro realizados. (B) Señal SPR para CXCL12 (30 nM) inyectado en PBS-T a varios pH. Un experimento representativo de tres realizados (media ± SEM). (C) Sensorgrama para CXCL12 (5-40 nM) sobre las PLVX4. Un experimento representativo de cinco realizados. (D) Representación de la curva de unión de CXCL12 en PBS-T usando concentraciones crecientes (5-80 nM). (E) Sensorgrama tras la inyección de CXCL12 en presencia (azul) o ausencia (rojo) del inhibidor AMD3100 (100 mM) respectivamente. Una curva representativa de cuatro realizadas.

Y la variación inter-inmovilización media fue del 10%. Valores que se encuentran dentro de la variabilidad aceptable para un método analítico (Wood 1999).

Tabla 2. Coeficientes de variación intra- e inter-ensayo de inmovilización para las concentraciones de CXCL12. Triplicados de las medidas de CXCL12 de tres chips de oro diferentes. Media de tres medidas, calculadas como la desviación estándar relativa (%RSD).

	Concentración de CXCL12 (nM)					Media
	5	10	20	30	40	
Variación Intra-ensayo (%RSD)						
Inmovilización 1	13,36296	10,89244	7,19478	6,85749	1,32169	7,925872
Inmovilización 2	12,85649	10,78548	5,68979	7,96614	2,04958	7,869496
Inmovilización 3	9,42809	8,88216	8,84956	7,01685	4,52032	7,739396
Variación Inter-ensayo (%RSD)						
3-inmovilizaciones	15,65917	11,15712	9,74751	8,59066	2,82549	9,59599

Además de la reproducibilidad, la reutilización del biosensor es un punto clave en la robustez del ensayo SPR (Homola 2003). La reutilización está relacionada con la estabilidad de la superficie a lo largo de un determinado número de ciclos de medida y regeneración. Para comprobarlo en nuestro sensor inyectamos la misma concentración de CXCL12 diariamente a lo largo de 4 semanas (Figura 22). Y comprobamos que la superficie mantuvo intacta su respuesta durante 150 ciclos de asociación y regeneración con una reducción máxima de la señal del 12%.

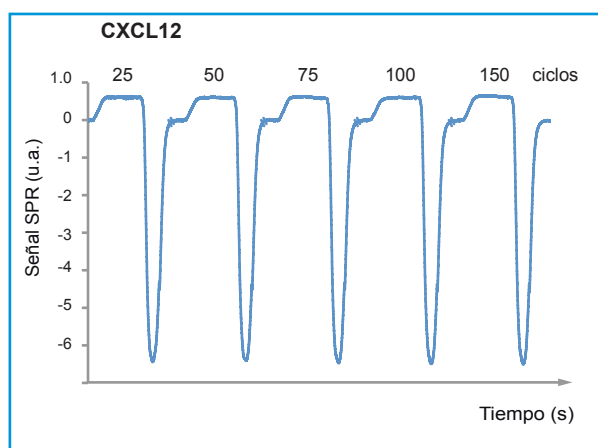


Figura 22. Reproducción de la unión específica de CXCL12 a las PLVX4 inmovilizadas en el biosensor experimental. Sucesivas medidas de CXCL12 (20 nM) de unión al receptor CXCR4 hasta completar 150 ciclos de curvas estables durante un periodo de cuatro semanas.

3. APLICACIONES DEL BIOSENSOR

3.1. DETECCIÓN DEL CXCL12 EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

Varias referencias bibliográficas resaltan los altos niveles circulantes de CXCL12 en pacientes con patologías autoinmunes, como artritis reumatoide (Hansen et al., 2006; Szekanecz et al., 2003), osteoartritis (Kanbe et al., 2002) o lupus eritematoso sistémico (Wang et al., 2010). Dado que tenemos un sistema que permite la medida de CXCL12 en tiempo real y de manera sencilla sin marcar ni manipular previamente el ligando, nos propusimos aplicar la técnica a la detección de CXCL12 en orina y su empleo en la cuantificación del ligando en orina de pacientes con artritis reumatoide. La detección supone un avance en el diagnóstico puesto que la orina se obtiene de forma simple y no invasiva, lo que permite además repetir la medida en periodos cortos, asimismo la congelación de la orina permite disponer de muestra durante un largo período de tiempo sin alteración.

3.1.1. Estudio de la interacción de la orina en el biosensor experimental

Testamos muestras de orina que corresponden a la segunda orina del día, cuyo rango de pH se encuentra entre 6,8 y 7,5 más adecuado que la primera de la mañana ($\text{pH} < 6,5$), ya que en un principio comprobamos para el biosensor experimental que pH inferiores a 7 o superiores a 7,5 van a dar lugar a una señal SPR disminuida, y como vamos a usar orinas inyectadas directamente sobre la superficie de las partículas necesitamos un pH lo más idóneo para la interacción. El tampón que va a encontrarse como flujo continuo va a ser PBS-T (0,05%) a una velocidad constante (60 $\mu\text{l}/\text{min.}$). La inmovilización de las PLVX4 fue la misma que en experimentos previos ($3 \times 10^5 \text{ TU}/\text{ml}$; $\Delta \approx 16$, señal SPR).

Contamos con muestras de orina de donantes sanos y pacientes con artritis reumatoide. Estas muestras están congeladas y son descongeladas en el momento de su uso para inyectarse directamente en el sensor. Las muestras de orina pasan sobre la superficie del sensor donde se encuentran inmovilizadas las partículas PLVX4 durante unos 10 minutos, tiempo suficiente para obtener una señal estable. Para determinar la habilidad del método descrito y detectar concentraciones de CXCL12 en muestras de orina de pacientes con AR y controles sanos, construimos una recta de calibrado añadiendo concentraciones crecientes de CXCL12 (5, 10, 20, 30, 40 nM) a las muestras de orina de donantes sanos (Figura 23A), y comparamos las señales con aquellas obtenidas para CXCL12 en PBS-T (Figura 23B). En ambos casos, las señales SPR se incrementan en paralelo al aumento en la concentración de CXCL12, no obstante aunque los valores en orina son ligeramente mayores que los obtenidos en PBS-T, existe una correlación lineal entre la concentración de CXCL12 y la señal SPR. Las medidas llevadas a cabo con las muestras de orina mantuvieron la superficie del sensor estable y reusable durante más de 120 ciclos a lo largo de 4 semanas, con una caída máxima de la señal SPR de un 12% del valor inicial, realizándose la regeneración con HCl 5mM.

El método desarrollado muestra una correlación lineal entre señal y concentración además de especificidad y reproducibilidad en la detección de CXCL12 en las muestras de orina, así que evaluamos los niveles de CXCL12 en las muestras de pacientes con AR. En la figura 23C se muestra la señal SPR obtenida para todas las muestras de orina inyectadas, al analizar las señales observamos que las obtenidas en las orinas de los pacientes con AR eran mayores que las muestras control. Para determinar la especificidad de la señal SPR en orina, añadimos el AMD3100 (100 μ M) en el flujo continuo y en las muestras de orina inyectadas. En este caso, las muestras de donantes sanos y las procedentes de pacientes con AR, disminuían su señal de forma variable dependiendo de la señal específica para CXCL12 (Figura 23D). Indicando que la señal era debida principalmente a la interacción específica del CXCL12 endógeno, sin embargo, las absorciones no específicas también contribuyen a la señal.

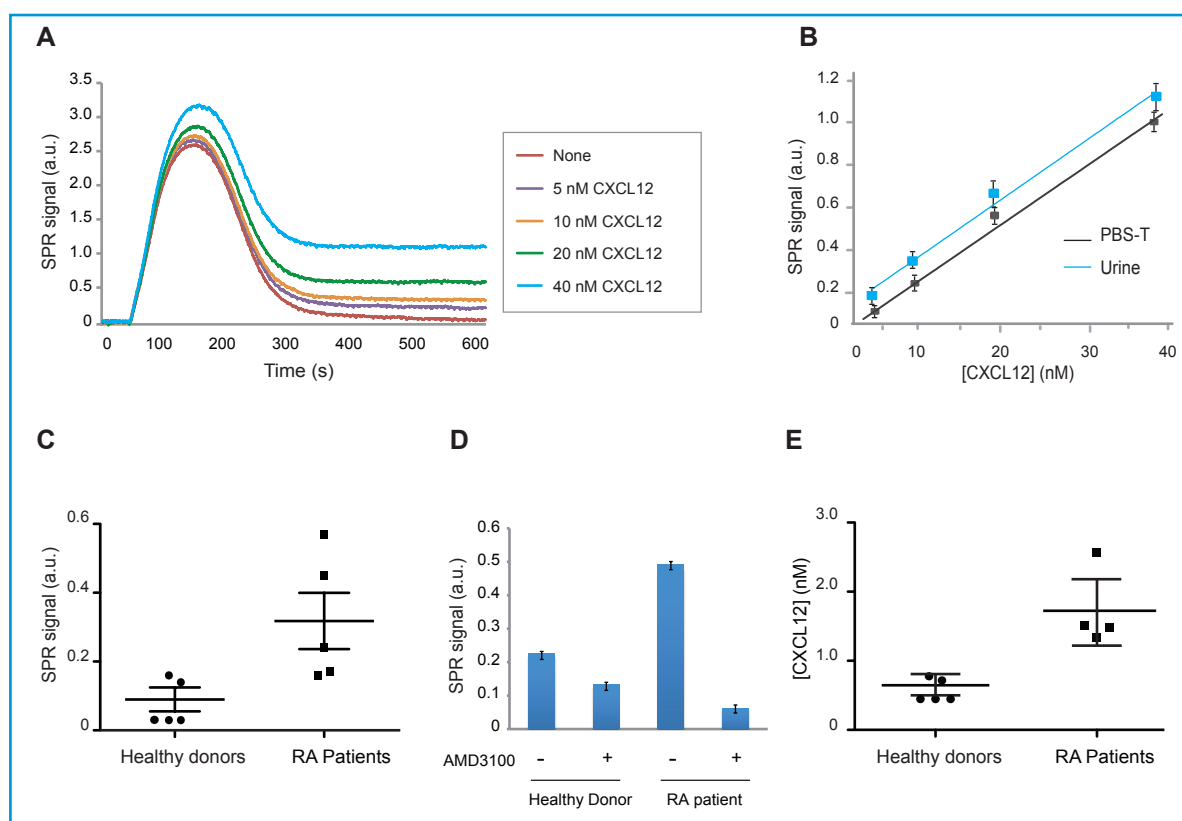


Figura 23. **Detección de CXCL12 en muestras de orina.** (A) Sensorgrama tras la inyección de orina control de donantes sanos en la que se han añadido concentraciones crecientes de CXCL12 exógeno (5-40 nM). Un experimento representativo de tres realizados. (B) Representación de las señales de las orinas en A. en función de la concentración de CXCL12 añadida. Un experimento representativo de cuatro realizados (media \pm SEM). (C) Comparación de la señal SPR de las muestras de orina de donantes sanos y de pacientes con AR (media \pm SEM). (D) Señal SPR de un control y un paciente en presencia y ausencia de AMD3100 (100 μ M). Los datos son expresados como media \pm SEM de tres experimentos realizados. (E) Detección por ELISA de CXCL12 en las mismas muestras de orina de donantes sanos y de pacientes con AR. Un experimento representativo de tres realizados (media \pm SEM).

La concentración de CXCL12 en las orinas fue determinada extrapolando las señales de las orinas a la recta patrón de la quimioquina en PBS-T. Los mayores niveles de CXCL12 en las orinas de pacientes con AR (4,28 - 17,33 nM) comparados con los controles sanos (0,14 - 3,96 nM) (Tabla 3), demuestran que el valor de CXCL12 obtenido en orina puede funcionar como un biomarcador para la AR. Estas medidas se repitieron como mínimo 5 veces dando siempre la misma señal. Nuestros datos sugieren la utilidad del método para la detección de pequeñas moléculas en muestras de orina.

Tabla 3. Comparación de los valores de CXCL12 obtenidos por SPR y ELISA en las muestras de orina.

	DS1	DS2	DS3	DS4	DS5	AR1	AR2	AR3	AR4	AR5
SPR (nM)	0,14	3,96	3,64	0,14	0,14	6,82	4,28	4,59	13,51	17,33
ELISA (nM)	0,56	0,93	0,91	0,56	0,56	-	1,69	1,88	1,91	2,89

DS = donante sano; AR = paciente con artritis reumatoide

3.1.2. Comparación SPR vs. ELISA de las muestras de orinas

En paralelo, usamos el ELISA para determinar los niveles de CXCL12 en las mismas muestras de orina y comparar los valores. Las concentraciones obtenidas para los pacientes con AR (1,69 - 2,89 nM) y los controles sanos (0,56 - 0,33 nM) son mucho menores que las obtenidas usando el SPR (Figura 23E). Sin embargo, los pacientes con AR muestran mayores niveles de CXCL12 en ambos ensayos. Aunque en el ELISA los valores son menores que aquellos obtenidos por SPR, estas diferencias pueden ser debidas a la distinta naturaleza de los sistemas usados en el ensayo; el ELISA se basa en el reconocimiento mediante anticuerpos, mientras en el SPR, el CXCL12 se une directamente a su receptor CXCR4.

En resumen, hemos mostrado que los pacientes con AR presentan unos niveles detectables de CXCL12 ligeramente superiores a las muestras de donantes sanos, capaces de ser detectados en nuestro sistema. Aunque deberíamos contar con un mayor número de muestras para poder tener una correlación con la actividad de la enfermedad, y analizar los diferentes complejos de CXCL12 en la orina.

3.2. ESTUDIO DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS DEL COMPLEJO CXCL12/CXCR4

Una de las principales aplicaciones de los biosensores es el estudio de los parámetros cinéticos que rigen la unión del ligando al receptor. El sistema definido es idóneo ya que utiliza el ligando sin marcar, y además puede evaluarse la interacción en tiempo real descomponiendo la afinidad en asociación y disociación. Dada la ausencia de soporte informático apropiado para el cálculo de afinidades en el biosensor experimental utilizado hasta ahora, decidimos emplear un SPR comercial, en concreto un Biacore 3000. En este caso el sensor cuenta con cuatro canales donde se puede inmovilizar de forma independiente las preparaciones, y se puede inyectar la misma muestra de forma simultánea en los cuatro canales. La superficie de contacto es de 1,2 mm², por lo que también se puede estimar la cantidad inmovilizada.

3.2.1. Inmovilización de las PLVX4 en el biosensor comercial

En este biosensor la inmovilización se llevó a cabo con un chip comercial CM5, preparado con una matriz tridimensional de dextrano sobre una superficie de oro. La química que se usa para activar los grupos carboxilo es la misma que se explicó anteriormente para la inmovilización en el biosensor experimental, usando EDC/NHS, mientras que el acoplamiento covalente vía grupos amino tiene lugar a un flujo bajo (5 µl/min.) en HBS-P. Ya que es importante que la incorporación de las partículas se realice con un pH por debajo del punto isoeléctrico de las partículas, usamos acetato a pH 4,5. Aquí las PLVX4 se diluyen a un pH ligeramente inferior al usado en el biosensor experimental (pH 6), debido a que antes el tampón de flujo continuo era agua, sin ningún tipo de aditivo, y ahora durante la inmovilización usamos HBS-P (0,005%), con una baja concentración de sal y un pH de 7,4. Seguidamente se inyectó etanolamina para neutralizar los éster no reactivos, y eliminar todo el material que no se había unido de forma covalente sobre la superficie (Figura 24). Los cambios en el índice de refracción fueron monitorizados en el sensorgrama por lo que pudimos obtener información de cada paso de la inmovilización. La presencia de cuatro canales de inmovilización permite dejar siempre un canal vacío que lleva los mismos pasos de activación e inactivación, y 3 canales para los análisis. Todos nuestros experimentos van a tener nivel de inmovilización de las partículas lentivirales de alrededor de 6.000 RU, siendo un nivel apropiado para el cálculo de las constantes cinéticas. Como tampón de flujo continuo usamos PBS-P (0,005%).

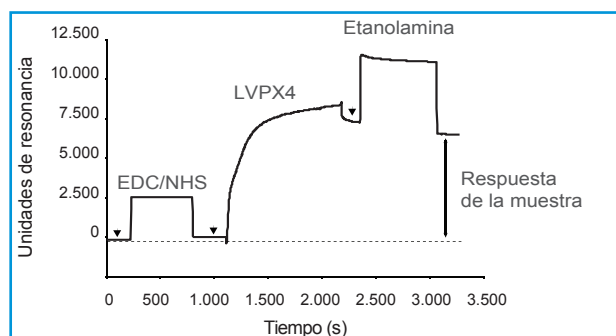


Figura 24. **Inmovilización de las PLVX4 en el chip comercial CM5.** Ciclo de activación con EDC/NHS, unión de las partículas PLVX4 y bloqueo de la superficie con etanolamina (~6.000 RU). Las flechas representan el momento de la inyección de las distintas soluciones.

3.2.2. Unión específica de CXCL2

Tal y como realizamos en el biosensor experimental inyectamos primero el anticuerpo CXCR4-01 (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2 min., 30 $\mu\text{l}/\text{min.}$) y como control un anticuerpo del mismo isotipo (IgM) en igual condición (Figura 25A). La presencia de CXCR4 sobre las partículas lentivirales quedó demostrada por la señal del anticuerpo CXCR4-01, y posteriormente confirmada con un anticuerpo comercial para CXCR4 (12G5), y como control un anticuerpo del mismo isotipo (IgG1) (Figura 25A). Dado que el 12G5 reconoce la conformación capaz de unir ligando de CXCR4 nuestros resultados indican que el CXCR4, se encuentra en su correcta conformación en la superficie de los viriones.

Inyectamos a continuación el ligando CXCL12 (200nM, 3 min., 30 $\mu\text{l}/\text{min.}$), observando una señal específica (Figura 25B). Como control de especificidad inyectamos la misma concentración de dos quimioquinas, CCL2 y CCL3, cuyos receptores CCR2 y CCR5, respectivamente, no están presentes en las partículas depositadas. Ninguno de los dos ligandos inyectados hizo variar la señal SPR (Figura 25B).

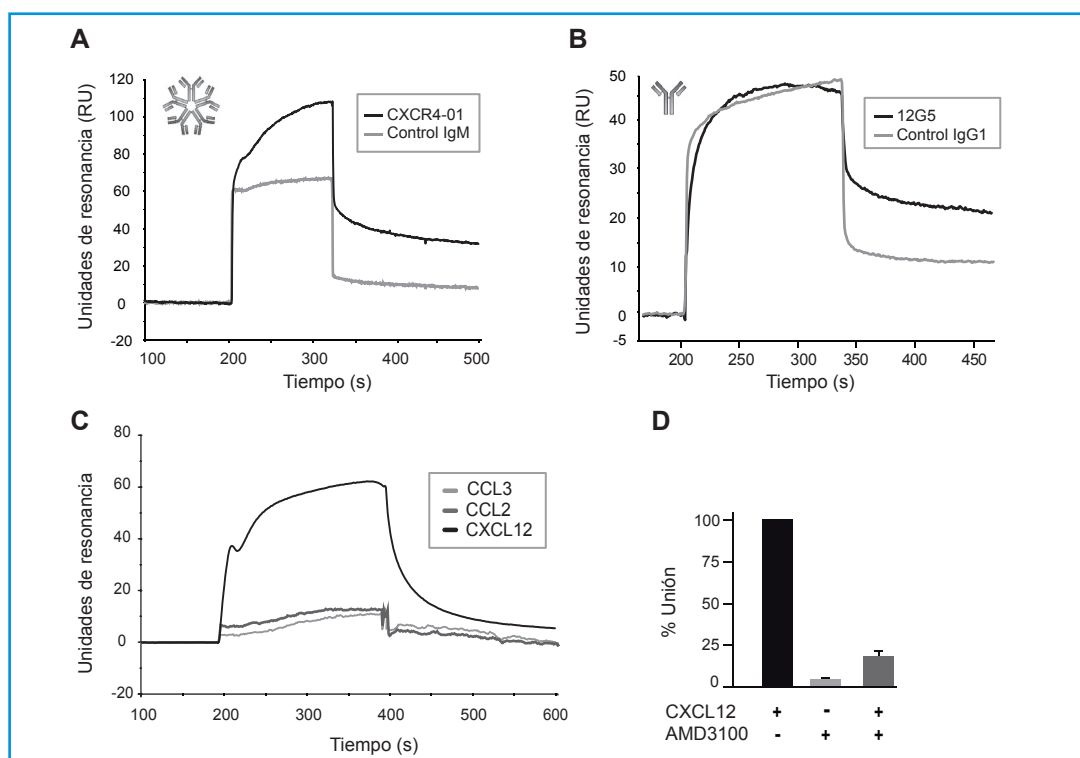


Figura 25. **Especificidad de CXCL12 en las PLVX4 en el chip comercial CM5.** (A) Sensorgrama producido por la inyección del anticuerpo CXCR4-01 (30 mg/ml) e isotipo control (IgM) sobre las partículas lentivirales PLVX4 inmovilizadas en la superficie del sensor después de substraer los valores de la superficie de referencia. La fase de asociación se determinó durante 125 s y la fase de disociación de 300 s antes de la regeneración. Un experimento representativo de al menos cuatro realizados. (B) Sensorgrama producido por la inyección del anticuerpo CXCR4 (12G5) (20 mg/ml) e isotipo control (IgG₁) sobre las PLVX4 inmovilizadas igual que en A. (C) Medidas para CXCL12, CCL2 y CCL3 (200 nM) de unión a las partículas lentivirales inmovilizadas en la superficie del sensor después de substraer los valores de la superficie de referencia. La fase de asociación de 180 s y la fase de disociación de 300 s antes de la regeneración. Se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. (D) Efecto del pretratamiento de las partículas PLVX4 con AMD3100 (100 μM) durante la unión del CXCL12. Representación de la máxima señal obtenida para CXCL12 (100 nM) y en presencia o en ausencia del inhibidor. Las señales han sido substraídas de la superficie de referencia y se han representado como porcentaje del valor de unión máxima de cinco experimentos (media \pm SD).

Igual que con el biosensor experimental, como control extra de especificidad de la unión de CXCL12, analizamos si la presencia del inhibidor AMD3100 bloqueaba la señal obtenida. Inyectamos el AMD3100 (50 μ M, 20 min., 5 μ l/min.), seguido de la inyección de CXCL12 (50 nM, 3 min., 30 μ l/min.) en presencia de AMD3100 (50 μ M) detectando una clara reducción en la señal promovida por la unión de CXCL12 (Figura 25C).

En resumen, nuestros resultados indican que al igual que sucedía en el caso del biosensor experimental, las PLVX4 inmovilizadas en la superficie del sensor comercial portan el receptor CXCR4, y que éste es capaz de unir específicamente su ligando, CXCL12.

3.2.3. Reproducibilidad y regeneración de la superficie

Igual que en el otro equipo, estudiamos diferentes soluciones de regeneración (HCl 5mM, glicina/HCl 20mM pH 2,5) eligiendo finalmente HCl 5 mM, ya que la solución de glicina no permitía una regeneración completa y el tiempo de vida útil del sensor se reducía. Por otro lado, el sistema es muy estable permitiendo 100 ciclos de regeneración sin alterarse la señal específica (no mostrado). Además, la repetición de 20 ciclos de inyección/regeneración determinó una alta reproducibilidad con una variación inferior al 10% (Figura 26).

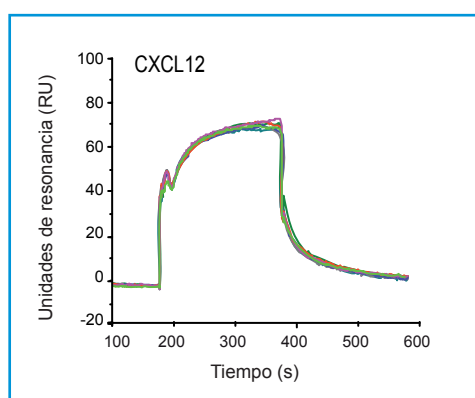


Figura 26. **Reproducibilidad de CXCL12 en Biacore.** Sensorgrama obtenido tras inyectar CXCL12 300 nM después de haber sometido al sensor a 20 ciclos de inyección con el ligando y posterior regeneración.

3.2.4. Cinética de CXCL12 a CXCR4 en las partículas lentivirales

Después de confirmar la especificidad y reproducibilidad en la unión de CXCL12 a CXCR4, también en este biosensor comercial, y para determinar los parámetros cinéticos de esta interacción, preparamos soluciones con concentraciones crecientes de CXCL12 (25 a 400 nM) en PBS-T. Una a una esas soluciones se inyectaron sobre el canal control (activado y desactivado) y el canal que contenía las PLVX4, a una velocidad de 30 μ l/min., y durante un tiempo de 3 min. Después de cada inyección se procedió a la regeneración con HCl 5mM. El canal referencia se usó para sustraer la señal de ruido inespecífico y poder obtener la señal específica que permite el cálculo de los parámetros cinéticos de la interacción. Observamos una señal máxima de \sim 100 RU (400 nM) y un valor mínimo de \sim 15 RU (25 nM) (Figura 27A). Los sensorgramas fueron procesados usando el programa *BIAevaluation*, y el modelo usado fue la interacción 1:1 de *Langmuir* debido a que

la estequiometría de unión supuesta para el par CXCL12/CXCR4 es de una molécula de ligando por receptor. Los datos usados incluyen la fase entera de asociación y disociación, omitiendo el ruido que se produce durante unos pocos segundos al principio de la inyección del ligando y al final de la misma (Figura 28). Los parámetros cinéticos calculados fueron: $k_a = 4,20 \pm 0,56 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$; $k_d = 8,24 \pm 0,11 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; y $K_D = 34,7 \pm 0,05 \text{ nM}$ (Tabla 4). A parte del ajuste simultáneo de ambas fases también se realizó el ajuste por separado para cada fase, siendo los resultados muy similares. Además, como test para validar las constantes cinéticas calculadas se determinó la K_D por el análisis en el equilibrio (Figura 27B), siendo $K_D = 35 \text{ nM}$. Estos parámetros cinéticos dieron resultados similares en todas las repeticiones realizadas usando distintos lotes de partículas y chips CM5, y correlacionan con los datos obtenidos con los análisis de *Scatchard* publicados (Di Salvo et al., 2000; Laguri et al., 2007; Lechertier et al., 2004).

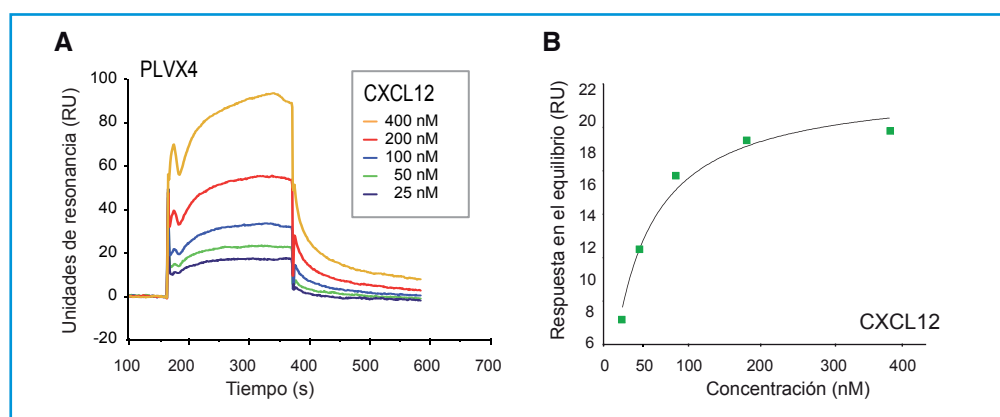


Figura 27. Análisis cinético de la interacción CXCL12/CXCR4 en las PLVX4. (A) Sensorgramas para CXCL12 de concentraciones crecientes (25-400 nM) inyectadas sobre las partículas PLVX4 inmovilizadas en la superficie del sensor Biacore 3000. La fase de asociación se midió durante 180 s y la fase de disociación de 300 s antes de la regeneración. Cada curva representa la señal de CXCL12 sustraída de la superficie de referencia. Un experimento representativo de al menos cinco realizados. (B) Gráfico de la respuesta en el equilibrio versus concentración de CXCL12 ajustado a los parámetros cinéticos del sensorgrama A.

3.2.5. Aumento de la expresión del CXCR4 en las partículas lentivirales

Para determinar si la expresión intrínseca de los niveles de CXCR4 influye en los parámetros cinéticos que rigen la interacción CXCL12/CXCR4, transfectamos transitoriamente células HEK293T, que como sabemos expresan endógenamente el receptor, con el plásmido pCDNA3.1-CXCR4 y usamos esas células para generar nuevas partículas (denominadas PLVX4X4). Las células y, por consiguiente, las partículas presentan mayor expresión del receptor de CXCR4 como se destaca del análisis por citometría de flujo usando el anticuerpo específico frente a CXCR4 (Figura 29A). De hecho la cuantificación del número de receptores por partícula viral mediante el método descrito anteriormente con marcaje de Metionina- S^{35} demostró en este caso que las partículas contenían ~ 350 moléculas de CXCR4 por virión (no mostrado).

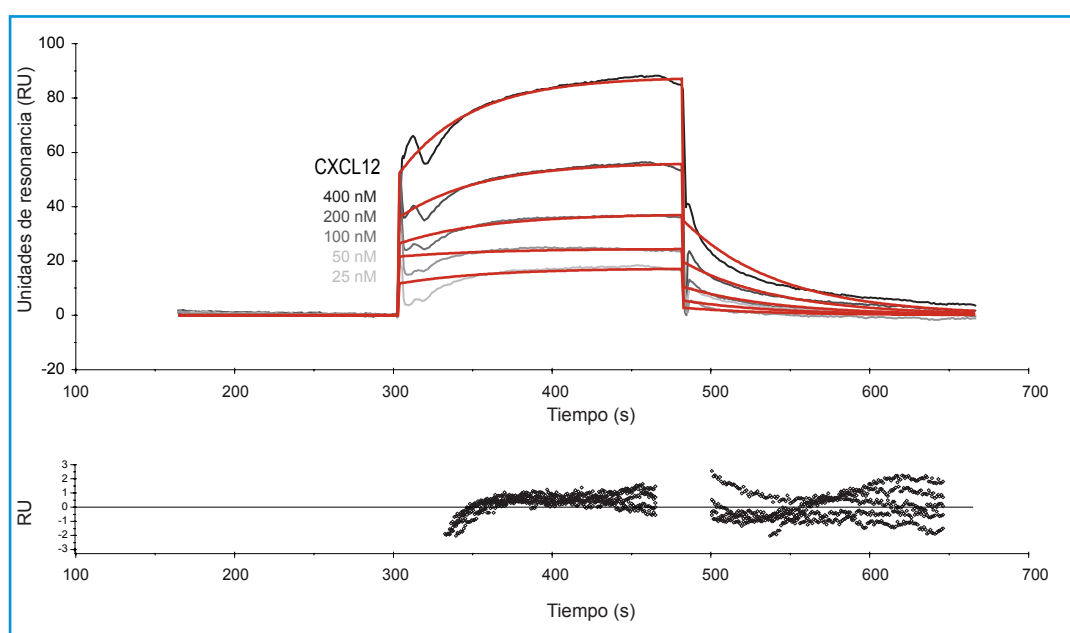


Figura 28. **Ajuste cinético de la interacción CXCL12/CXCR4 en las PLVX4.** (A) Sensorgrama correspondiente a la inyección de las soluciones CXCL12 (5-400 nM) correspondiente a la cinética (negro) y los ajustes matemáticos realizados (rojo) para el análisis de los parámetros cinéticos. (B) Ruido del ajuste y determinación de la cinética. El valor de χ^2 para el ajuste fue de 1.71. La escala de tiempo para los valores residuales se encuentran en el orden del nivel de ruido (~ 2 RU).

Los experimentos de SPR con estas partículas inmovilizadas en el chip CM5 comercial se realizaron a un nivel comparable con los experimentos anteriores (un depósito de PLVX4X4 que alcanzó ~ 6.000 RU). Inyectamos entonces concentraciones crecientes de CXCL12 (25 a 400 nM) en las mismas condiciones anteriores (30 $\mu\text{l}/\text{min.}$, 3 min.) sobre el canal control (activado y desactivado) y el canal con las PLVX4X4. Obteniéndose una señal máxima de asociación de ~ 150 RU (400 nM) y mínima de ~ 20 RU (25 nM), señales ligeramente superiores a las obtenidas con las partículas PLVX4 (Figura 29B) consecuencia del mayor número de receptores presentes. Los parámetros cinéticos de unión fueron, en este caso, también determinados usando distintos lotes de partículas, y diferentes chips, aplicando el modelo de *Langmuir*, los datos fueron: k_a $3,43 \pm 0,34 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$; k_d $13 \pm 0,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; y K_D $36,9 \pm 0,18 \text{ nM}$ (Tabla 4). Como test para validar las constantes cinéticas calculadas se determinó la K_D por el análisis en el equilibrio (Figura 29C).

Los resultados indican que los niveles de expresión de CXCR4 en los viriones afectan a la señal SPR máxima, aunque no de una forma lineal debido a las propiedades intrínsecas de la estructura tridimensional de la superficie. Sin embargo, las constantes cinéticas calculadas no varían. La comparación de resultados también indican que, para el receptor CXCR4, el uso de células HEK239T sin transfectar, facilita la producción viral, permitiendo una señal suficiente para calcular los parámetros cinéticos.

3.2.6. Estudio de las partículas virales que presentan CXCR4 y CCR5

Dado que CXCR4 y CCR5 forman heterodímeros en la superficie celular (Isik et al., 2008; Percherancier et al., 2005) nos planteamos determinar si la presencia de CCR5 alteraba la afinidad de CXCL12 por CXCR4. De forma similar a la descrita hasta ahora preparamos partículas lentivirales en células HEK293T con CXCR4 endógeno transfectadas transitoriamente con pCDNA3.1-CCR5 y las partículas resultantes, PLVR5, fueron inmovilizadas sobre la superficie de un CM5 en las mismas condiciones que las partículas PLVX4. La inmovilización realizada en el biosensor Biacore, permitió comparar gracias a los cuatro canales presentes en el chip, la unión de CXCL12 a CXCR4 en ambos tipos de partículas (Figura 30A). Y los cálculos con el programa *BIAevaluation* demostró que la afinidad de CXCL12 por CXCR4 no se ve afectada por la presencia de los complejos CXCR4/CCR5 ($k_a = 1,29 \pm 0,65 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$; $k_d = 4,55 \pm 0,01 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; y $K_D = 35,3 \pm 0,05 \text{ nM}$).

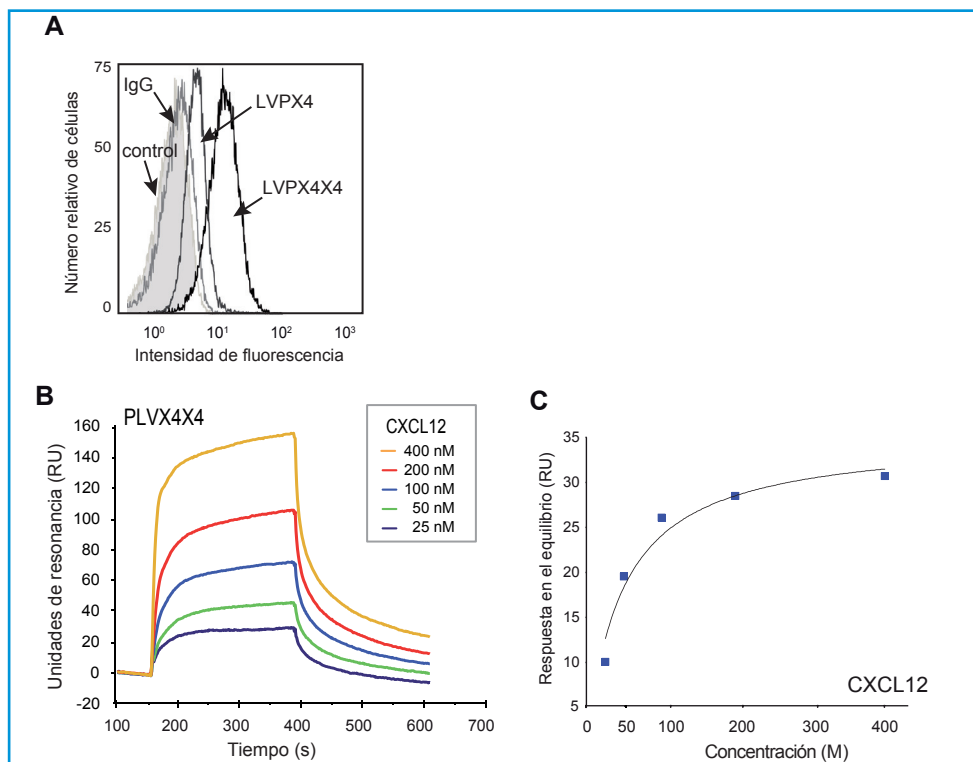


Figura 29. **Análisis cinético de la interacción CXCL12/CXCR4 utilizando partículas PLVX4X4.**

(A) Expresión de CXCR4 en la superficie de las partículas acopladas a bolas de látex por citometría de flujo usando un anticuerpo específico frente al CXCR4 en las partículas PLVX4X4 (línea negra continua), partículas PLVX4 (línea negra discontinua), como control de especificidad un anticuerpo del mismo isotipo (línea gris) y bolas sin acoplar (gris). (B) Sensorgramas obtenidos tras la inyección de soluciones de CXCL12 de concentraciones crecientes (25-400 nM) inyectadas sobre los viriones PLVX4X4. La fase de asociación de 180 s y la fase de disociación de 300 s antes de la regeneración. Cada curva representa la señal de CXCL12 sustraída de la superficie de referencia. Un experimento representativo de al menos cinco realizados. (C) Gráfico de la respuesta en el equilibrio versus concentración de ligando ajustado a los parámetros cinéticos del sensorgrama B.

Además, en las partículas PLVR5 pudimos comprobar que el sistema permitía testar otras quimioquinas específicas para el CCR5. Para ello pasamos sobre todas las superficies inmovilizadas (control, PLVX4 y PLVR5) la quimioquina CCL3, ligando específico para CCR5, observándose sólo unión en el canal que presentaba las partículas con CCR5 (Figura 30B). Como control de especificidad pasamos también CCL2, que como cabría esperar no originó ninguna señal específica en ninguna de las partículas ya que su receptor es el CCR2 (Figura 30C).

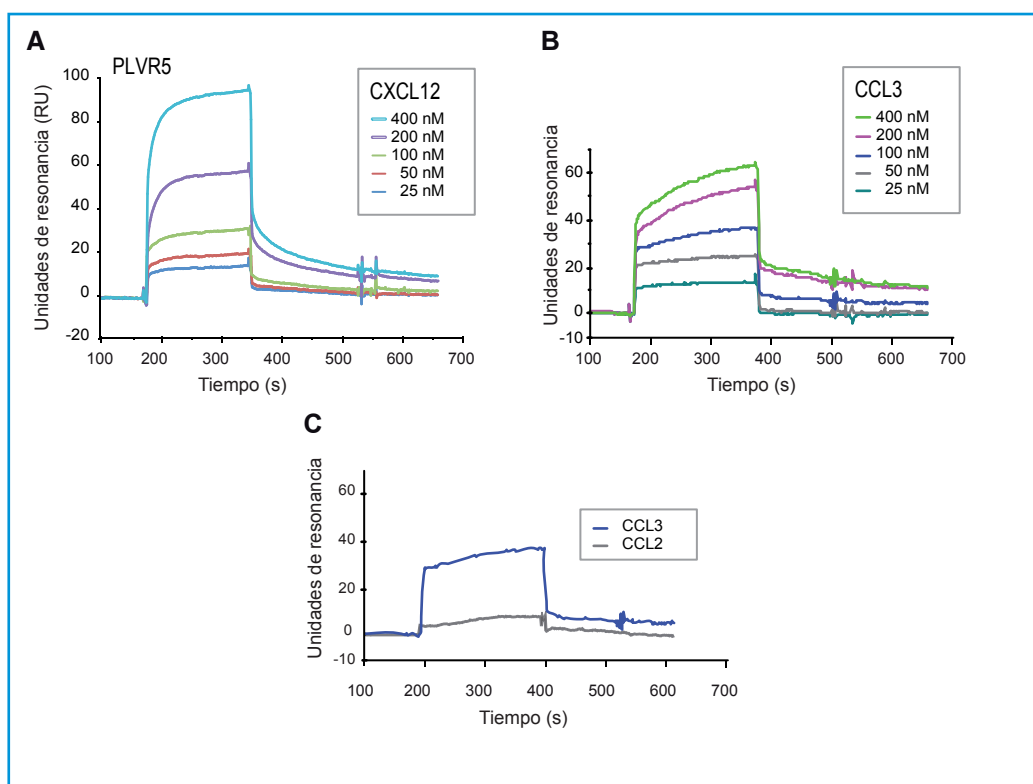


Figura 30. **Análisis de la interacción CXCL12/CXCR4 usando las PLVR5 que llevan los receptores CXCR4 y CCR5.** (A) Sensorgramas para CXCL12 en concentraciones crecientes (25-400 nM) inyectadas sobre los viriones PLVR5 inmovilizados en la superficie del sensor comercial. La fase de asociación de 180 s y la fase de disociación de 300 s antes de la regeneración. Cada curva representa la señal de CXCL12 substraída de la superficie de referencia vacía. Un experimento representativo de al menos tres realizados (B) Sensorgramas obtenidos tras la inyección de distintas soluciones de CCL3 en concentraciones crecientes (25-400 nM) inyectadas sobre las partículas PLVR5 inmovilizadas en la superficie del sensor comercial. La fase de asociación de 180 s y la fase de disociación de 300 s antes de la regeneración. Cada curva representa la señal de CCL3 substraída de la superficie de referencia. Un experimento representativo de al menos tres realizados. (C) Medidas de CCL3 y CCL2 (100 nM) de unión a las partículas PLVR5 inmovilizadas en la superficie del sensor después de substraer los valores de la superficie de referencia. La fase de asociación de 180 s y la fase de disociación de 300 s antes de la regeneración.

3.3. EFECTO DE LOS GLICOSAMINOGLICANOS EN LA UNIÓN DE CXCL12 AL RECEPTOR CXCR4

Los proteoglicanos se expresan en la membrana de muchos tipos celulares. Estos polisacáridos son capaces de unir quimioquinas, y presentárselas a los receptores. Esta unión es funcionalmente importante, ya que mejora la concentración local de quimioquinas en la cercanía al receptor y permite la formación de gradientes quimiotácticos *in vivo* (Tanaka et al., 1993). Durante la salida de las partículas lentivirales de la célula además de CXCR4 podrían también llevarse PG como los heparan sulfato (HSPG). En esa posible situación CXCL12 se uniría no sólo a CXCR4 sino también a los GAG alterando así los datos cinéticos definidos en el apartado anterior. De hecho, el sindecano-4 es capaz de unir a CXCL12 (Brule et al., 2009; Charnaux et al., 2005; Hamon et al., 2004). Otros como el CD44, glicoproteína transmembrana implicada en la adhesión entre células y diferentes componentes de la matriz extracelular no une CXCL12 (Avigdor et al., 2004; Hamon et al., 2004).

Mediante un análisis por inmunofluorescencia descartamos que las células HEK293T expresasen el sindecano-4 (Figura 31A) o CD44 (Figura 31B). Como control positivo de estos ensayos usamos fibroblastos HT29 y células HeLa. El marcaje de membrana se controló con un anticuerpo anti-CD9 (Figura 31A). Estos resultados que correlacionan con datos publicados anteriormente (Carvalho et al., 2010; Cheng and Sharp, 2006) descartan que la unión de CXCL12 a algún GAG en la superficie de las partículas virales interviniesen en los estudios cinéticos de unión de CXCL12 y CXCR4.

3.3.1. Cinética de los glicosaminoglicanos y CXCL12 al receptor CXCR4 en las partículas lentivirales

El uso de los biosensores para analizar en tiempo real las medidas y calcular los parámetros cinéticos hace de esta técnica un buen método para estudiar el efecto de otras moléculas en los ratios de asociación/disociación del ligando/receptor. En este caso quisimos analizar si la unión de proteoaminoglicanos a las quimioquinas modulan o afectan la unión de éstas al receptor (Johnson et al., 2005).

Para ello, incubamos una concentración constante de CXCL12 (200 nM, 30 min., 37 °C) con concentraciones crecientes de heparina o de heparan sulfato (7,8 ng/ml - 4 µg/ml), y posteriormente inyectamos estas soluciones sobre la superficie del sensor donde teníamos inmovilizadas las partículas PLVX4 y sobre el canal control (activado y desactivado). Como solución de regeneración usamos el HCl 5mM. Como controles del experimento se realizaron inyecciones con las mismas concentraciones de heparina y heparan sulfato en ausencia de CXCL12, señales que luego fueron sustraídas también para calcular la señal específica del complejo CXCL12/GAG al receptor CXCR4. Con el diseño de este experimento observamos que los complejos que incluían

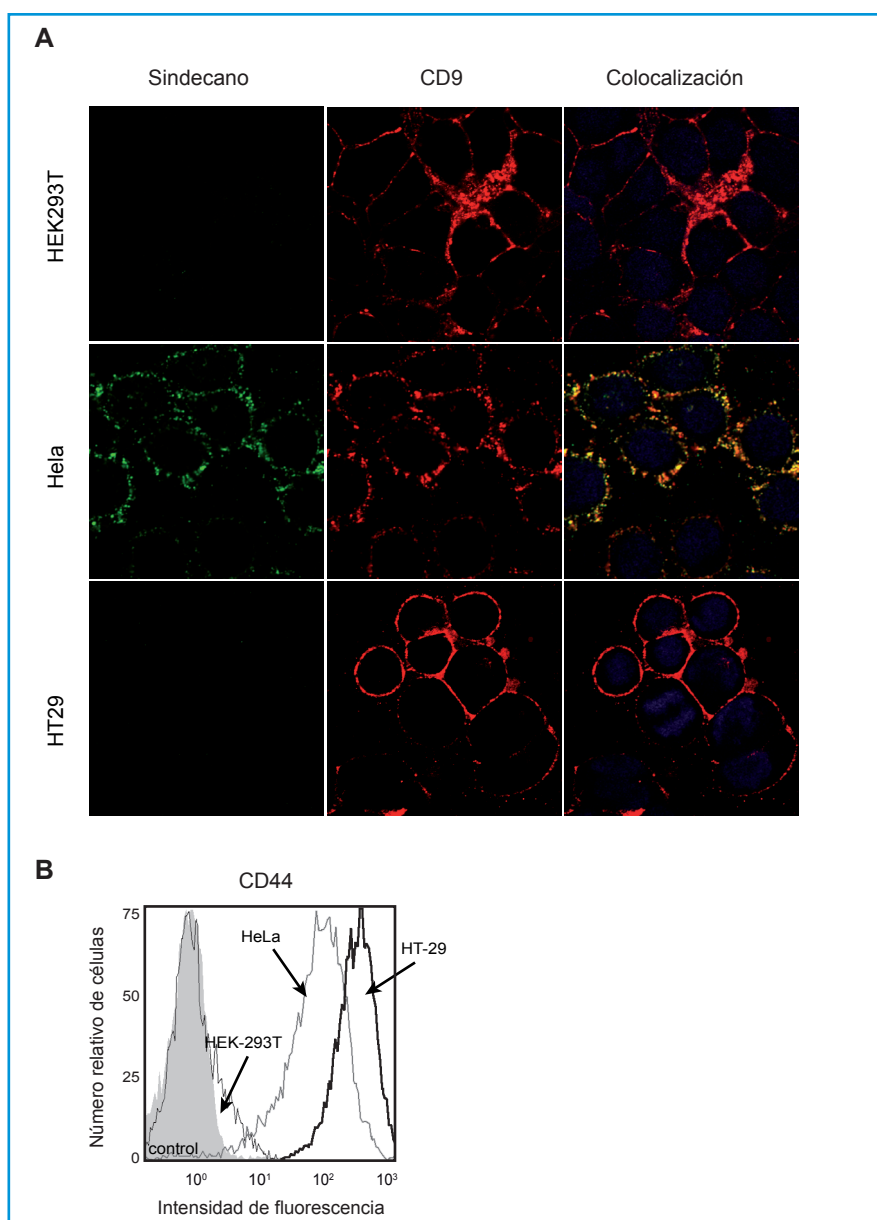


Figura 31. **Células HEK293T que no expresan el sindecan-4 en su superficie.** (A) Expresión de sindecan-4 en la superficie celular evaluada por inmunofluorescencia usando anticuerpos específicos, como control positivo se presenta la tinción de células HeLa y como control negativo células HT29. El marcaje de membrana fue controlado analizando la tinción de un anticuerpo anti-CD9 (magnificación 63x). (B) Expresión de CD44 en la superficie de las HEK293T evaluada por citometría de flujo usando un anticuerpo específico. Las células HT29 y HeLa se usaron como controles positivos.

concentraciones pequeñas de heparina ($< 1\mu\text{g/ml}$) con la quimioquina, no modifican la señal del CXCL12 sólo (~ 90 RU para $7,8$ ng/ml). Sin embargo, a concentraciones de heparina $>1\mu\text{g/ml}$ la unión del CXCL12 la señal se redujo significativamente (Figura 32A). Similares resultados se obtuvieron para el caso del heparan sulfato. Estos datos coinciden con los publicados a altas concentraciones de GAG solubles que compiten con la unión de la quimioquina por el receptor (Kuschert et al., 1999). Por otro lado, cuando usamos condroitin sulfato A, no observamos nunca alteraciones de la unión del receptor (Figura 32B), de hecho este GAG no une CXCL12 (Murphy et al. 2007).

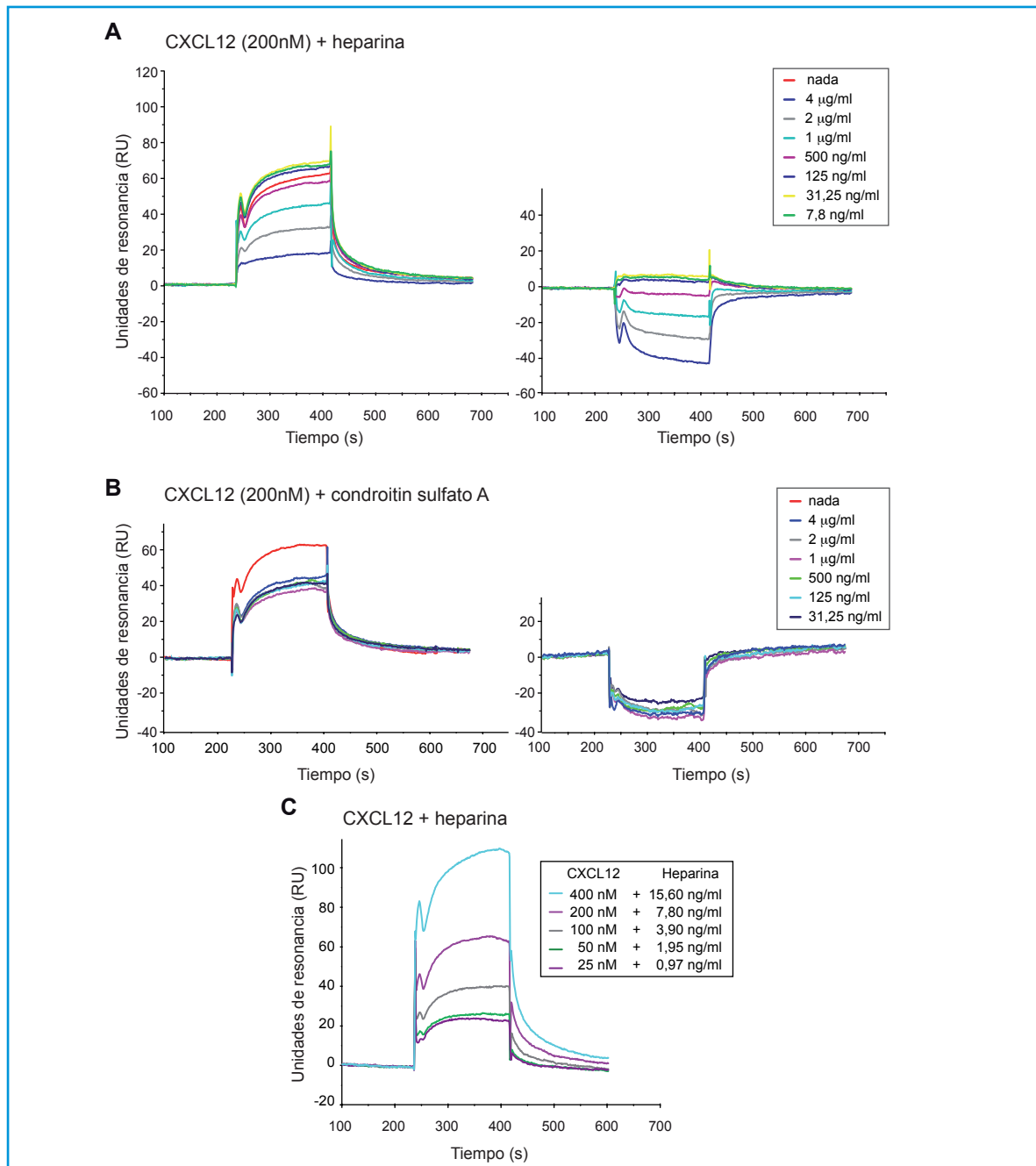


Figura 32. **Efecto de los glicosaminoglicanos sobre la unión de CXCL12 al receptor CXCR4.** (A) Sensorgrama del CXCL12 a 200 nM, sólo o incubado con concentraciones crecientes de heparina (7,8 ng/ml a 4 mg/ml), sobre la superficie inmovilizada con las PLVX4. Las señales individuales del CXCL12 (200 nM) y heparina (7,8 ng/ml a 4 mg/ml) de la superficie control, son sustraídas para obtener el sensorgrama mostrado. La fase de asociación de 180 s y la fase de disociación de 300 s antes de la regeneración (izquierda). Sensorgrama de estos valores donde también se substraee la señal de CXCL12 (200 nM) de la superficie de las PLVX4 (derecha). Un experimento representativo de al menos cinco realizados. (B) Sensorgrama tras la inyección de CXCL12 a 200 nM, sólo o incubado con concentraciones crecientes de condroitina sulfato (31,25 ng/ml a 4 mg/ml), sobre la superficie inmovilizada con las PLVX4. Las señales individuales del CXCL12 (200 nM) y heparina (31,25 ng/ml a 4 mg/ml) de la superficie control, son sustraídas para obtener el sensorgrama mostrado. La fase de asociación de 180 s y la fase de disociación de 300 s antes de la regeneración (izquierda). De estos valores también se substraee el CXCL12 de la superficie de las PLVX4 como en A (derecha). Un experimento representativo de tres realizados. (C) Sensorgrama obtenido al inyectar el complejo CXCL12/heparina incubado con concentraciones crecientes (ratio 1:384), sobre la superficie inmovilizada con las PLVX4. Las señales individuales del CXCL12 y la heparina de la superficie referencia son sustraídas para obtener el sensorgrama mostrado. La fase de asociación de 180 s y la fase de disociación de 300 s antes de la regeneración. Un experimento representativo de al menos tres realizados.

Para estudiar esa competición, inyectamos CXCL12 en presencia de heparina y en paralelo inyectamos heparina sola o CXCL12 sólo. Al eliminar las respuestas de heparina y CXCL12 por separado, confirmamos que en condiciones de exceso de GAG, el complejo CXCL12/GAG no se une al CXCR4 (Figura 32A). Estudios similares realizados con una alta concentración de heparina o heparan sulfato, comprobaron que el complejo CXCL12/GAG interfiere con la unión de la quimioquina a su receptor bloqueando la región N-terminal del CXCL12, y confirman esta hipótesis (Sadir et al., 2001).

Después realizamos el ensayo con la máxima concentración de heparina que no alteraba la unión del complejo al CXCR4 (200 nM CXCL12 y 7,8 ng/ml heparina). Concentraciones crecientes de CXCL12/heparina con un ratio constante (200 nM CXCL12 : 7,8 ng/ml) fueron inyectadas en el canal control vacío y sobre las PLVX4 (30 μ l/min., 3 min.). La superficie fue regenerada con HCl 5mM. Las respuestas máxima y mínima obtenidas fueron de ~ 100 RU y ~ 20 RU, para las fases de asociación, respectivamente (Figura 32C). Los sensorgramas procesados por el modelo de *Langmuir* muestran que los parámetros cinéticos de unión difieren de los obtenidos cuando evaluamos la unión de CXCL12 a CXCR4, y son: k_a $5,49 \pm 0,14 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$; k_d $1,63 \pm 0,10 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y K_D $66,7 \pm 0,01 \text{ nM}$ (Tabla 4). Estos datos indican que la heparina no sólo modula la disponibilidad de CXCL12 en el medio, sino que también reduce ligeramente la afinidad (K_D) de CXCL12 a su receptor CXCR4 (34,7 nM CXCL12 sólo; y 66,7 nM complejo CXCL12/heparina; $p \leq 0.01$). Las diferencias son atribuidas a una mayor disociación (k_d) del complejo CXCL12/heparina ($8,24 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ CXCL12; $1,63 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ complejo CXCL12/heparina; $p \leq 0.001$). Aunque, estadísticamente las diferencias son significativas, el estrecho margen entre los valores de las constantes de afinidad para la quimioquina sola o acomplexada con la heparina *in vitro* sugieren, sin embargo, una influencia limitada en la biología de CXCL12.

Tabla 4. Constantes cinéticas para la interacción de CXCL12 al receptor CXCR4, en los distintos sistemas empleados.

	Constantes cinéticas		
	$k_a (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$K_d (\text{s}^{-1})$	$K_D (\text{nM})$
CXCL12 (PLVX4)	$4,20 \pm 0,56 \times 10^5$	$8,24 \pm 0,11 \times 10^{-3}$	$34,7 \pm 0,05$
CXCL12 (PLVX4X4)	$3,43 \pm 0,34 \times 10^5$	$13 \pm 0,5 \times 10^{-3}$	$36,9 \pm 0,18$
CXCL12 (PLVR5)	$1,29 \pm 0,65 \times 10^5$	$4,55 \pm 0,01 \times 10^{-3}$	$35,3 \pm 0,05$
CXCL12/GAG (PLVX4)	$5,49 \pm 0,14 \times 10^5$	$1,63 \pm 0,10 \times 10^{-3}$	$66,7 \pm 0,01$

DISCUSIÓN

La identificación y detección de biomarcadores es un asunto de máximo interés para el diagnóstico de las enfermedades, definir el estado de la patología y predecir la respuesta de los pacientes a los tratamientos. La cuestión alcanza su más alto nivel en aquellas enfermedades que por complejidad y alta prevalencia necesitan un diagnóstico precoz, y/o clasificar los pacientes en función de los tratamientos más eficaces. La mayoría de los métodos de detección son inmunoensayos basados en el uso de anticuerpos específicos y/o ligandos marcados con isótopos radiactivos u otro tipo de moléculas que facilitan la detección. Sin embargo, el hecho de tener que manipular ligandos y receptores puede alterar las medidas, y del mismo modo los ensayos basados en anticuerpos pueden no dar una idea real de la presencia de ligando activo. Los anticuerpos reconocen la presencia de un epitopo concreto en la proteína pero eso no implica que la proteína sea funcional. De hecho en muchas patologías la presencia de modificaciones post-transduccionales como por ejemplo, sulfatación (Farzan et al., 1999), citrulinación (Fisher et al., 2011), o proteólisis (Kanbe et al., 2002), alteran la función de los ligandos, aunque la proteína sea detectable.

En este sentido el uso de biosensores ópticos en los que se inmovilizan los receptores es un modo de detección de pequeñas moléculas de interés clínico muy sensible que permite detecciones en tiempo real, y sobre todo que garantiza que son proteínas funcionales al disponer del propio receptor como base del reconocimiento (Burg et al., 2007; Zheng et al., 2005). El método es muy dependiente de la disponibilidad de proteínas purificadas, algo posible cuando hablamos de anticuerpos o receptores cuya purificación mantiene intactas sus capacidades de unir ligando. Algunos receptores sin embargo, no resisten la solubilización con detergentes (Sarramegn et al., 2006). Éste es el caso de los receptores pertenecientes a la familia de los GPCR, cuya estructura de siete dominios α -hélice transmembrana (Dixon et al., 1986) los hacen extremadamente hidrofóbicos, y por lo tanto estructura y función dependen de la presencia de un ambiente lipídico a su alrededor (Yoshiura et al., 2010). Existen algunos ejemplos de biosensores que han empleado GPCR solubilizados pero siempre requieren un proceso muy laborioso de purificación y reconstitución previo a la detección (Salamon et al., 1994) que además en ningún caso asegura completamente su integridad. Incluso se han diseñado métodos en dos pasos que retienen el GPCR mediante anticuerpos monoclonales inmovilizados en el sensor y después reconstituyen el ambiente lipídico (Navratilova et al., 2006; Salamon et al., 1994; Stenlund et al., 2003), pero las alteraciones que produce el detergente y su variabilidad no pueden tampoco descartarse en esta técnica.

En este proyecto hemos diseñado y caracterizado un biosensor óptico basado en la inmovilización de partículas lentivirales que contienen CXCR4, un receptor de quimioquinas que pertenece a los GPCR, y tiene como ligando específico CXCL12. El sistema es muy robusto y sensible y permite la detección de esta quimioquina en orina de pacientes con artritis reumatoide. Detectar CXCL12 tiene un gran interés ya que el par CXCL12/CXCR4 se ha asociado a patologías como cáncer (Muller et al., 2001), infección por VIH (Bleul et al., 1996a), síndrome de WHIM (Hernandez et al., 2003), y enfermedades autoinmunes, como osteoartritis o artritis reumatoide (Hansen et al., 2006).

Durante el ciclo vital de los lentivirus se produce la conversión del ARN viral simple en ADN de doble cadena por efecto de la transcriptasa inversa en el citoplasma de la célula infectada, el ADN provírico integrado es transcrito y en el proceso de salida de la célula huésped la partícula viral arrastra parte de la membrana celular, por lo tanto incorpora las proteínas que allí se contengan (Nguyen et al., 1999). El uso de las partículas virales tiene además la ventaja de proporcionar un sistema muy homogéneo de medida ya que todas tienen un tamaño aproximado de 100 nm de diámetro. El sistema de producción de partículas virales en este proyecto es la transfección en células HEK293T con los plásmidos correspondientes, lo que asegura además un sistema basal en el que poder cambiar el receptor a evaluar con sólo transfectarlo transitoriamente en la célula huésped.

Desarrollo de la técnica y caracterización de las partículas lentivirales como vehículo portador de los receptores de quimioquinas

La SPR es una técnica usada para analizar las interacciones de las proteínas en tiempo real, permitiendo una evaluación de los parámetros cinéticos que rigen la unión en el equilibrio (Rich and Myszk, 2007). Los experimentos en un biosensor óptico se llevan a cabo inmovilizando una proteína (ligando) en una superficie, normalmente de oro, para posteriormente monitorizar la interacción con un segundo elemento (analito) en solución. Los biosensores SPR miden cambios en el índice de refracción del analito que pasa en solución al unirse a la molécula inmovilizada en el sensor. Se forman entonces complejos que tienen una fase de asociación y otra de disociación, y que seguimos en tiempo real. En este proyecto hemos generado partículas lentivirales en células HEK293T, que expresan CXCR4 de manera endógena, sin embargo como también hemos demostrado al expresar el receptor CCR5 en las células, podemos además generar partículas virales que lleven ese receptor. Con sólo expresar un receptor en las HEK293T podemos obtener partículas virales que lo expresasen en su superficie, por lo que el sistema es muy versátil.

Las partículas lentivirales incorporan parte de la membrana de la célula huésped, y en ella las proteínas allí presentes. De hecho confirmamos la presencia de CXCR4 en la partícula viral usando varios métodos y su posterior cuantificación demostró que con 210 receptores por virión, la técnica tiene suficiente sensibilidad para detectar CXCL12 5nM. Una estrategia parecida fue

usada para preparar partículas retrovirales que expresaban CD4 y CXCR4, y analizar así en un biosensor la unión de la proteína de la envuelta gp120 del virus VIH-1 (Hoffman et al., 2000). La incorporación de CD4 y, CCR5 o CXCR4, en las partículas retrovirales permitió además infectar aquellas células que expresasen la gp120 de las cepas virales X4 o R5 del HIV-1 (Endres et al., 1997; Schnell et al., 1997), indicando que la conformación del receptor en los viriones se asemejaba a su estructura en la membrana celular. Aunque las condiciones obtenidas permiten una sensibilidad de la técnica adecuada, ésta podría mejorarse usando células transfectadas transitoriamente con CXCR4. De ese modo aumenta la presencia de este receptor en la membrana celular y por lo tanto también en las partículas virales correspondientes, PLVX4X4. Aunque lógicamente el uso de estas partículas aumenta el rango de detección, los parámetros cinéticos que rigen la unión no varían. La eficiencia con la cual una proteína puede ser incorporada a la partícula viene influida por su localización, grado de expresión y la naturaleza del dominio citoplasmático de la proteína (Young et al., 1990), de esta forma es preciso que se localice en la superficie de la célula. Algunas, proteínas retenidas en orgánulos intracelulares han sido, sin embargo, redirigidas a la superficie celular e incorporadas así en los viriones producidos, modificando su retención o los motivos de localización. En principio cualquier proteína presente en la membrana de la célula huésped puede ser incorporada en los viriones, aunque alguna evidencia sugiere que la salida de los virus de la célula se produce de manera organizada por lugares específicos de la membrana (Nguyen and Taub, 2003; Zhang et al., 2000), lo que restringe la incorporación de proteínas a aquellas localizadas en esas estructuras concretas.

La caracterización de la especificidad del receptor CXCR4 en las partículas se llevó a cabo inmovilizando de forma covalente sobre la superficie del sensor los viriones, para de ese modo obtener señales medibles de unión de los ligandos. Las señales obtenidas al inyectar el anticuerpo anti-CXCR4, demuestran la presencia del receptor. Receptor que es funcional ya que une específicamente CXCL12 y no otras quimioquinas inyectadas. Además la señal de CXCL12 es bloqueada al incubar las partículas con un inhibidor específico de CXCR4, AMD3100. Ciertamente es que la señal máxima al equilibrio producida por el anticuerpo es menor de lo esperado para una proteína de peso molecular tan elevado (950.000 Da), sobre todo si se compara con la señal producida por CXCL12 (molécula de 7.500 Da). Basándonos en el nivel de inmovilización (~6.000 RU), si estimamos el peso molecular de las partículas virales (~1,5 x 10⁸ g/mol), y el número de copias del receptor por partícula, la máxima señal teórica que debería obtenerse con el anticuerpo sería de aproximadamente 600 RU. Como las partículas son inmovilizadas en una matriz tridimensional es factible que una fracción de la superficie de las partículas sea inaccesible a los anticuerpos. El hecho es que una IgM (950.000 Da) es una molécula de gran tamaño y una vez unida a un receptor podría promover un efecto estérico negativo en la unión de otras inmunoglobulinas a sitios cercanos, y por tanto producir una menor señal SPR detectable.

Aunque sabemos por los controles realizados con ligando y AMD3100 que la unión al receptor es específica, comprobamos también la ausencia en la membrana de las partículas de glicosaminoglicanos ya que su presencia podría suponer otro punto de unión del ligando. CXCL12 une por ejemplo el sindecano-4 con alta afinidad (Brule et al., 2009; Charnaux et al., 2005b; Hamon et al., 2004). Los estudios de inmunofluorescencia en las células HEK293T demostraron la ausencia de ese GAG y corroboraron que la unión de CXCL12 en el biosensor correspondía a su retención por CXCR4.

Análisis de muestras biológicas como aplicación del desarrollo de nuestro sistema

La posibilidad de detectar CXCL12 nos permitió diseñar un método para cuantificar la presencia de CXCL12 en fluidos biológicos y aplicarlo a la medida de esta quimioquina en orina de pacientes con artritis reumatoide. El uso de orina facilita las medidas ya que su obtención es no invasiva, y además contiene menor concentración de proteínas como albúmina, transferrina o microglobulinas que, al interaccionar con la superficie del sensor, aumentan el ruido de la señal. El contenido iónico o el pH (Johansson and Hellenas, 2004) son variables a tener en cuenta en las determinaciones con biosensores tal y como aquí se demuestra. Por estas razones el uso de la primera orina de la mañana, muy ácida no resulta adecuada en esta determinación por lo que los ensayos siempre la han obviado. Al ser un fluido de fácil extracción se asegura la disponibilidad en poco tiempo y de manera repetida, también hemos observado que su congelación no afecta a la detección. Por otro lado se sabe que CXCL12 está presente en suero, plasma y líquido sinovial de pacientes con ciertas enfermedades autoinmunes como la osteoartritis o la artritis reumatoide (Hansen et al., 2006; Kanbe et al., 2002; Mittal et al., 2003; Szekanecz et al., 2003), por lo que es posible su presencia en orina también. Los experimentos realizados con tampones demuestran una señal óptima en el rango de pH entre 7 – 7,5. Una vez evaluadas las muestra de pacientes con AR observamos en ellas mayor señal que en los individuos sanos, señal que era específica porque se bloqueó al tratar con AMD3100. Además la señal se interpoló en la recta patrón realizada en PBS o en orina control transformándose en concentración de CXCL12 real. La orina de los pacientes tiene mayor cantidad de la quimioquina que la de los donantes sanos. De hecho esta observación se confirmó evaluando las mismas muestras mediante un ELISA comercial. Dicho esto, comprobamos que los valores de ELISA eran menores que los obtenidos en el sensor. Ambos ensayos emplean diferentes sistemas de medida que pueden explicar esas diferencias. El ELISA reconoce CXCL12 mediante anticuerpos siempre que el epítipo reconocido esté presente, y en este biosensor se determina CXCL12 mediante unión al receptor y por lo tanto será CXCL12 activo. Las quimioquinas interaccionan con GAG (Sadir et al., 2001) y ello puede alterar la unión de los anticuerpos. De hecho en algunas enfermedades los GAG se han encontrado en orina (De Muro et al., 2001). Además el complejo quimioquina/GAG tendría mayor señal SPR. Por otro lado las quimioquinas en solución forman oligómeros (Veldkamp et al., 2005), y de hecho la existencia de esos complejos varía con el pH y concentración iónica del medio (Gozansky et al., 2005). Los

complejos de quimioquina se detectan como una única molécula en ELISA pero por su masa mayor pueden cuantificarse diferente en SPR. La detección de más ligando CXCL12 en orina de pacientes con AR, abre la posibilidad de hacer estudios con un número alto de muestras para determinar su valor como posible biomarcador de la patología, y de la respuesta a los tratamientos terapéuticos. Además esta prueba de concepto permite abordar de manera similar otros ligandos y biomoléculas cuya detección en la actualidad sea compleja metodológicamente o no disponga de anticuerpos monoclonales específicos.

Parámetros físico-químicos de la unión de CXCL12 a CXCR4 y efecto de la presencia de glicosaminoglicanos

Otra de las posibles aplicaciones del método aquí diseñado es el análisis de los parámetros cinéticos que rigen la interacción CXCL12/CXCR4. La constante de afinidad obtenida, 34 nM, es coincidente con la obtenida por otras metodologías, por ejemplo usando CXCL12 marcado con I^{125} y análisis de *Scatchard* (Di Salvo et al., 2000; Laguri et al., 2007; Lechertier et al., 2004). Sin embargo nuestro análisis refleja una afinidad mayor que la que se obtiene usando biosensores en los que el receptor es retenido con un anticuerpo tras solubilizarlo con detergentes (K_D de 156 - 180 nM) (Stenlund et al., 2003). Esta divergencia puede ser debida a que en el segundo caso el receptor CXCR4 es solubilizado y, por lo tanto no se puede descartar interferencia del detergente. Es posible también que en nuestro método estén presentes otras proteínas de membrana que modulen la unión del ligando, o incluso las diferentes conformaciones que pueda adoptar el receptor y cuya influencia puede evaluarse usando la inmovilización con anticuerpos del solubilizado. La técnica de las partículas lentivirales presenta un ambiente tridimensional muy estable, que hace que la superficie pueda ser regenerada más de 100 veces sin cambios apreciables en la interacción del CXCL12. Los experimentos han sido llevados a cabo usando varias preparaciones de partículas lentivirales producidas durante un periodo de dos años. Y usando diferentes chips y múltiples repeticiones en cada uno de ellos, que han llevado a resultados muy similares.

Los receptores de quimioquinas forman homo- y heterodímeros en la superficie celular, para determinar si los conceptos heterodiméricos afectan a la unión de CXCL12 a CXCR4, transfectamos HEK293T con CCR5 e inmovilizamos las partículas virales que contenían CXCR4 y CCR5 en el biosensor. Los análisis cinéticos demostraron que CXCL12 se une a su receptor con igual afinidad, esté o no CCR5 presente. Este dato indica que a diferencia de lo que sucede con los receptores de opiáceos (GPCR) donde los heterodímeros alteran la afinidad por los ligandos (Jordan and Devi, 1999), en el caso de las quimioquinas no ocurre así, al menos en el complejo CXCR4/CCR5.

Como comentamos el uso de los biosensores permite analizar en tiempo real la interacción entre moléculas, midiendo de forma precisa las constantes cinéticas de asociación y disociación (k_a y k_d). Esta separación entre ambas determinaciones es muy interesante al evaluar el efecto de

otras moléculas en la unión de la quimioquina al receptor. Los glicosaminoglicanos se expresan en la membrana celular y juegan un papel importante en la unión de las quimioquinas a los receptores, mejora la concentración local de quimioquinas en la cercanía al receptor y permite la formación de gradientes quimioatrayentes (Friand et al., 2009; Hoogewerf et al., 1997; Kuschert et al., 1999; Tanaka et al., 1993). Los complejos quimioquina/GAG facilitan la unión al receptor (Johnson et al., 2005). El CXCL12 muestra alta afinidad por el heparan sulfato y la heparina (Bleul et al., 1996b; Sadir et al., 2001). Nuestros resultados muestran que en exceso de heparina se produce una interferencia en la unión de CXCL12 al receptor lo que contrasta con el dato de que la interacción se realiza usando residuos específicos diferentes a los empleados en su unión al receptor (Amara et al., 1999). Sin embargo nuestra observación es conocida, y hay datos bibliográficos indicando que un exceso de GAG compite por la unión de la quimioquina al receptor (Kuschert et al., 1999). Ensayos usando CXCL18-I¹²⁵ y CCL3-I¹²⁵ demuestran que altas concentraciones de heparina inhiben la unión al receptor (Charnaux et al., 2005a), altas concentraciones de heparina y heparan sulfato inhiben la función de las quimioquinas sobre los leucocitos (Kuschert et al., 1997; Murphy et al., 2007). La heparina sin fraccionar y la heparina de bajo peso molecular también inhiben la unión del CXCL12 al CXCR4 en las células CHO y en las líneas celulares humanas de cáncer de mama, por lo que se bloquea la señalización, y esto puede ser útil en la prevención de metástasis en cáncer de mama dirigida por quimioquinas (Harvey et al., 2007). Estas observaciones contrastan con la clara separación estructural entre los dominios de unión del CXCL12 al receptor y al GAG (Amara et al., 1999; Kuschert et al., 1999; Laguri et al., 2008; Sadir et al., 2001). Por RMN y cristalografía por rayos X se demuestra la existencia de dos dominios estructurales de unión de CXCL12 a heparina y heparan sulfato, uno corresponde a las láminas- $\beta 1$ y $\beta 2$ en la interfaz dimérica, y el segundo es la región N-terminal y la región α -hélice en la unión al receptor (Murphy et al., 2007). Este último al coincidir con el sitio de unión al receptor podría explicar el efecto inhibitorio observando en presencia de dosis muy elevadas de GAG.

Cuando el análisis de la cinética de unión se realiza con concentración de GAG que no altera la unión del CXCL12 a CXCR4, se observa una reducción significativa pero leve de la constante de afinidad por este último. Sin embargo, la asociación no está afectada ($k_a = 4,20 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $5,49 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para CXCL12 y CXCL12/GAG, respectivamente), y la diferencia radica en la disociación ($k_d = 8.24 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y $1.63 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$, para CXCL12 y CXCL12/GAG, respectivamente). Los resultados confirman que los GAG modulan la interacción entre las quimioquinas y sus receptores. Y nuestros datos indican que los complejos con los GAG reducirían la afinidad del CXCL12 a su receptor por un incremento en la velocidad de disociación. Aunque la diferencia es significativa para los valores de K_D y k_d no parece que su influencia en los efectos biológicos de la quimioquina sea muy importante.

En resumen, la metodología desarrollada permite estudiar en detalle las interacciones de los ligandos a sus receptores empleando los receptores en el contexto de su membrana biológica, y demuestra el interés en utilizar biosensores ópticos para los estudios cinéticos, la detección en muestras biológicas y el diagnóstico, así como en sistemas de búsqueda de agonistas y antagonistas.

CONCLUSIONES

1. La transfección de células HEK293T con los plásmidos pLVTHM, pPAX2 y pVSVG permite obtener partículas lentivirales que contienen partes de membrana celular en su superficie, y por consiguiente también los receptores allí expresados.
2. Las partículas lentivirales funcionan de este modo como vehículo para expresar los receptores de quimioquinas en el contexto de la membrana celular, y pueden ser inmovilizadas en la superficie de un biosensor óptico
3. El método diseñado permite la detección específica de CXCL12 activo en solución y su uso para la determinación de este ligando en orina de pacientes con artritis reumatoide. El ensayo es robusto, reproducible y presenta una alta sensibilidad.
4. Los pacientes con artritis reumatoide presentan una mayor concentración de CXCL12 en orina que los individuos sanos. El diseño del ensayo es adecuado para abordar estudios a mayor escala que permitan evaluar el valor de CXCL12 como biomarcador en artritis reumatoide.
5. El método desarrollado es trasladable a un biosensor comercial con similares parámetros de sensibilidad y reproducibilidad.
6. El sistema diseñado permite estudiar en tiempo real los parámetros cinéticos que rigen la unión de CXCL12 a CXCR4. El análisis permite conocer la constante de asociación y disociación para el cálculo de la afinidad.
7. La versatilidad de la técnica permite comparar la unión de CXCL12 a su receptor en el contexto de las distintas conformaciones del mismo. Los heterodímeros CXCR4/CCR5 no alteran la afinidad con la que el CXCL12 se une a CXCR4.
8. Una alta concentración de glicosaminoglicanos bloquea la unión de CXCL12 a CXCR4 probablemente porque a esa concentración, glicosaminoglicanos y receptor, comparten parte del dominio de unión en CXCL12.
9. A bajas concentraciones de glicosaminoglicanos, el complejo GAG/CXCL12 presenta menor afinidad por CXCR4 que el ligando solo. El estudio en detalle de las constantes de asociación y disociación demuestra que el defecto se encuentra en esta última, ya que el complejo GAG/CXCL12 se disocia de CXCR4 más rápido que la quimioquina sola.

BIBLIOGRAFÍA

A

Akkina, R.K., Walton, R.M., Chen, M.L., Li, Q.X., Planelles, V., and Chen, I.S. (1996). High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol* 70, 2581-2585.

Allen, S.J., Crown, S.E., and Handel, T.M. (2007). Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 25, 787-820.

Amara, A., Lorthioir, O., Valenzuela, A., Magerus, A., Thelen, M., Montes, M., Virelizier, J.L., Delepiepierre, M., Baleux, F., Lortat-Jacob, H., *et al.* (1999). Stromal cell-derived factor-1alpha associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine. *J Biol Chem* 274, 23916-23925.

Avigdor, A., Goichberg, P., Shivtiel, S., Dar, A., Peled, A., Samira, S., Kollet, O., Hershkovich, R., Alon, R., Hardan, I., *et al.* (2004). CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow. *Blood* 103, 2981-2989.

B

Bacon, K., Baggiolini, M., Broxmeyer, H., Horuk, R., Lindley, I., Mantovani, A., Maysushima, K., Murphy, P., Nomiyama, H., Oppenheim, J., *et al.* (2002). Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res* 22, 1067-1068.

Baggiolini, M. (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392, 565-568.

Baik, S.S., Doms, R.W., and Doranz, B.J. (1999). HIV and SIV gp120 binding does not predict coreceptor function. *Virology* 259, 267-273.

Balabanian, K., Lagane, B., Pablos, J.L., Laurent, L., Planchenault, T., Verola, O., Lebbe, C., Kerob, D., Dupuy, A., Hermine, O., *et al.* (2005). WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood* 105, 2449-2457.

Balabanian, K., Levoye, A., Klemm, L., Lagane, B., Hermine, O., Harriague, J., Baleux, F., Arenzana-Seisdedos, F., and Bachelier, F. (2008). Leukocyte analysis from WHIM syndrome patients reveals a pivotal role for GRK3 in CXCR4 signaling. *J Clin Invest* 118, 1074-1084.

Baldwin, J.M. (1994). Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6, 180-190.

Balkwill, F. (2004). Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 4, 540-550.

Balliet, J.W., and Bates, P. (1998). Efficient infection mediated by viral receptors incorporated into retroviral particles. *J Virol* 72, 671-676.

Baribaud, F., Edwards, T.G., Sharron, M., BreLOT, A., Heveker, N., Price, K., Mortari, F., Alizon, M., Tsang, M., and Doms, R.W. (2001). Antigenically distinct conformations of CXCR4. *J Virol* 75, 8957-8967.

Bartz, S.R., Rogel, M.E., and Emerman, M. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 cell cycle control: Vpr is cytostatic and mediates G2 accumulation by a mechanism which differs from DNA damage checkpoint control. *J Virol* 70, 2324-2331.

Bernfield, M., Gotte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M.L., Lincecum, J., and Zako, M. (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 68, 729-777.

Blanpain, C., Doranz, B.J., Vakili, J., Rucker, J., Govaerts, C., Baik, S.S., Lorthioir, O., Migeotte, I., Libert, F., Baleux, F., *et al.* (1999). Multiple charged and aromatic residues in CCR5 amino-terminal domain are involved in high affinity binding of both chemokines and HIV-1 Env protein. *J Biol Chem* 274, 34719-34727.

Bleul, C.C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., and Springer, T.A. (1996a). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382, 829-833.

Bleul, C.C., Fuhlbrigge, R.C., Casasnovas, J.M., Aiuti, A., and Springer, T.A. (1996b). A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 184, 1101-1109.

Boldajipour, B., Doitsidou, M., Tarbashevich, K., Laguri, C., Yu, S.R., Ries, J., Dumstrei, K., Thelen, S., Dorries, J., Messerschmidt, E.M., *et al.* (2011). Cxcl12 evolution--subfunctionalization of a ligand through altered interaction with the chemokine receptor. *Development* 138, 2909-2914.

Borroni, E.M., Mantovani, A., Locati, M., and Bonecchi, R. (2010). Chemokine receptors intracellular trafficking. *Pharmacol Ther* 127, 1-8.

Briggs, J.A., Wilk, T., Welker, R., Krausslich, H.G., and Fuller, S.D. (2003). Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J* 22, 1707-1715.

Brule, S., Friand, V., Sutton, A., Baleux, F., Gattegno, L., and Charnaux, N. (2009). Glycosaminoglycans and syndecan-4 are involved in SDF-1/CXCL12-mediated invasion of human epitheloid carcinoma HeLa cells. *Biochim Biophys Acta* 1790, 1643-1650.

Bukrinsky, M.I., Haggerty, S., Dempsey, M.P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M., and Stevenson, M. (1993). A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 365, 666-669.

Burg, T.P., Godin, M., Knudsen, S.M., Shen, W., Carlson, G., Foster, J.S., Babcock, K., and Manalis, S.R. (2007). Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid. *Nature* 446, 1066-1069.

Burger, J.A., and Kipps, T.J. (2006). CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 107, 1761-1767.

C

Carvallo, L., Munoz, R., Bustos, F., Escobedo, N., Carrasco, H., Olivares, G., and Larrain, J. (2010). Non-canonical Wnt signaling induces ubiquitination and degradation of Syndecan4. *J Biol Chem* 285, 29546-29555.

Charnaux, N., Brule, S., Chaigneau, T., Saffar, L., Sutton, A., Hamon, M., Prost, C., Lievre, N., Vita, C., and Gattegno, L. (2005a). RANTES (CCL5) induces a CCR5-dependent accelerated shedding of syndecan-1 (CD138) and syndecan-4 from HeLa cells and forms complexes with the shed ectodomains of these proteoglycans as well as with those of CD44. *Glycobiology* 15, 119-130.

Charnaux, N., Brule, S., Hamon, M., Chaigneau, T., Saffar, L., Prost, C., Lievre, N., and Gattegno, L. (2005b). Syndecan-4 is a signaling molecule for stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/ CXCL12. *FEBS J* 272, 1937-1951.

Cheng, C., and Sharp, P.A. (2006). Regulation of CD44 alternative splicing by SRm160 and its potential role in tumor cell invasion. *Mol Cell Biol* 26, 362-370.

Cheng, Z.J., Zhao, J., Sun, Y., Hu, W., Wu, Y.L., Cen, B., Wu, G.X., and Pei, G. (2000). beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4. *J Biol Chem* 275, 2479-2485.

Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.J., Kuhn, P., Weis, W.I., Kobilka, B.K., *et al.* (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318, 1258-1265.

Clark-Lewis, I., Kim, K.S., Rajarathnam, K., Gong, J.H., Dewald, B., Moser, B., Baggiolini, M., and Sykes, B.D. (1995). Structure-activity relationships of chemokines. *J Leukoc Biol* 57, 703-711.

Coffin, J.M. (1979). Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. *J Gen Virol* 42, 1-26.

Crump, M.P., Gong, J.H., Loetscher, P., Rajarathnam, K., Amara, A., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J.L., Baggiolini, M., Sykes, B.D., and Clark-Lewis, I. (1997). Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J* 16, 6996-7007.

Cyster, J.G. (1999). Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 286, 2098-2102.

D

De Muro, P., Faedda, R., Formato, M., Re, F., Satta, A., Cherchi, G.M., and Carcassi, A. (2001). Urinary glycosaminoglycans in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 19, 125-130.

Dealwis, C., Fernandez, E.J., Thompson, D.A., Simon, R.J., Siani, M.A., and Lolis, E. (1998). Crystal structure of chemically synthesized [N33A] stromal cell-derived factor 1alpha, a potent ligand for the HIV-1 "fusin" coreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6941-6946.

Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., *et al.* (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381, 661-666.

Di Salvo, J., Koch, G.E., Johnson, K.E., Blake, A.D., Daugherty, B.L., DeMartino, J.A., Sirotina-Meisher, A., Liu, Y., Springer, M.S., Cascieri, M.A., *et al.* (2000). The CXCR4 agonist ligand stromal derived factor-1 maintains high affinity for receptors in both Galpha(i)-coupled and uncoupled states. *Eur J Pharmacol* 409, 143-154.

Dixon, R.A., Kobilka, B.K., Strader, D.J., Benovic, J.L., Dohlman, H.G., Frielle, T., Bolanowski, M.A., Bennett, C.D., Rands, E., Diehl, R.E., *et al.* (1986). Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321, 75-79.

Doitsidou, M., Reichman-Fried, M., Stebler, J., Koprunner, M., Dorries, J., Meyer, D., Esguerra, C.V., Leung, T., and Raz, E. (2002). Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell* 111, 647-659.

Doranz, B.J., Baik, S.S., and Doms, R.W. (1999). Use of a gp120 binding assay to dissect the requirements and kinetics of human immunodeficiency virus fusion events. *J Virol* 73, 10346-10358.

Dotta, L., Tassone, L., and Badolato, R. (2011). Clinical and genetic features of Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis (WHIM) syndrome. *Curr Mol Med* 11, 317-325.

E

Elisseeva, E.L., Slupsky, C.M., Crump, M.P., Clark-Lewis, I., and Sykes, B.D. (2000). NMR studies of active N-terminal peptides of stromal cell-derived factor-1. Structural basis for receptor binding. *J Biol Chem* 275, 26799-26805.

Endres, M.J., Jaffer, S., Haggarty, B., Turner, J.D., Doranz, B.J., O'Brien, P.J., Kolson, D.L., and Hoxie, J.A. (1997). Targeting of HIV- and SIV-infected cells by CD4-chemokine receptor pseudotypes. *Science* 278, 1462-1464.

F

Farzan, M., Mirzabekov, T., Kolchinsky, P., Wyatt, R., Cayabyab, M., Gerard, N.P., Gerard, C., Sodroski, J., and Choe, H. (1999). Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell* 96, 667-676.

Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., and Berger, E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-877.

Fisher, B.A., Plant, D., Brode, M., van Vollenhoven, R.F., Mathsson, L., Symmons, D., Lundberg, K., Ronnelid, J., and Venables, P.J. (2011). Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 and clinical and radiological outcomes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 70, 1095-1098.

Friand, V., Haddad, O., Papy-Garcia, D., Hlawaty, H., Vassy, R., Hamma-Kourbali, Y., Perret, G.Y., Courty, J., Baleux, F., Oudar, O., *et al.* (2009). Glycosaminoglycan mimetics inhibit SDF-1/CXCL12-mediated migration and invasion of human hepatoma cells. *Glycobiology* 19, 1511-1524.

G

Gasmi, M., Glynn, J., Jin, M.J., Jolly, D.J., Yee, J.K., and Chen, S.T. (1999). Requirements for efficient production and transduction of human immunodeficiency virus type 1-based vectors. *J Virol* 73, 1828-1834.

Gosling, J., Dairaghi, D.J., Wang, Y., Hanley, M., Talbot, D., Miao, Z., and Schall, T.J. (2000). Cutting edge: identification of a novel chemokine receptor that binds dendritic cell- and T cell-active chemokines including ELC, SLC, and TECK. *J Immunol* 164, 2851-2856.

Gozansky, E.K., Louis, J.M., Caffrey, M., and Clore, G.M. (2005). Mapping the binding of the N-terminal extracellular tail of the CXCR4 receptor to stromal cell-derived factor-1alpha. *J Mol Biol* 345, 651-658.

Grabarek, Z., and Gergely, J. (1990). Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Anal Biochem* 185, 131-135.

Grassi, F., Cristino, S., Toneguzzi, S., Piacentini, A., Facchini, A., and Lisignoli, G. (2004). CXCL12 chemokine up-regulates bone resorption and MMP-9 release by human osteoclasts: CXCL12 levels are increased in synovial and bone tissue of rheumatoid arthritis patients. *J Cell Physiol* 199, 244-251.

H

- Hamon, M., Mbemba, E., Charnaux, N., Slimani, H., Brule, S., Saffar, L., Vassy, R., Prost, C., Lievre, N., Starzec, A., *et al.* (2004). A syndecan-4/CXCR4 complex expressed on human primary lymphocytes and macrophages and HeLa cell line binds the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Glycobiology* *14*, 311-323.
- Handel, T.M., and Domaille, P.J. (1996). Heteronuclear (¹H, ¹³C, ¹⁵N) NMR assignments and solution structure of the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) dimer. *Biochemistry* *35*, 6569-6584.
- Handel, T.M., Johnson, Z., Crown, S.E., Lau, E.K., and Proudfoot, A.E. (2005). Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annu Rev Biochem* *74*, 385-410.
- Hansen, I.B., Ellingsen, T., Hornung, N., Poulsen, J.H., Lottenburger, T., and Stengaard-Pedersen, K. (2006). Plasma level of CXC-chemokine CXCL12 is increased in rheumatoid arthritis and is independent of disease activity and methotrexate treatment. *J Rheumatol* *33*, 1754-1759.
- Harvey, J.R., Mellor, P., Eldaly, H., Lennard, T.W., Kirby, J.A., and Ali, S. (2007). Inhibition of CXCR4-mediated breast cancer metastasis: a potential role for heparinoids? *Clin Cancer Res* *13*, 1562-1570.
- Hatse, S., Princen, K., Bridger, G., De Clercq, E., and Schols, D. (2002). Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS Lett* *527*, 255-262.
- Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F., Beckmann, E., and Downing, K.H. (1990). Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J Mol Biol* *213*, 899-929.
- Henderson, R., and Schertler, G.F. (1990). The structure of bacteriorhodopsin and its relevance to the visual opsins and other seven-helix G-protein coupled receptors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *326*, 379-389.
- Hernandez, P.A., Gorlin, R.J., Lukens, J.N., Taniuchi, S., Bohinjec, J., Francois, F., Klotman, M.E., and Diaz, G.A. (2003). Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet* *34*, 70-74.
- Hoffman, T.L., Canziani, G., Jia, L., Rucker, J., and Doms, R.W. (2000). A biosensor assay for studying ligand-membrane receptor interactions: binding of antibodies and HIV-1 Env to chemokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 11215-11220.
- Holmes, W.D., Consler, T.G., Dallas, W.S., Rocque, W.J., and Willard, D.H. (2001). Solution studies of recombinant human stromal-cell-derived factor-1. *Protein Expr Purif* *21*, 367-377.
- Hoogewerf, A.J., Kuschert, G.S., Proudfoot, A.E., Borlat, F., Clark-Lewis, I., Power, C.A., and Wells, T.N. (1997). Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry* *36*, 13570-13578.
- Hunt, L.T., and Dayhoff, M.O. (1970). The occurrence in proteins of the tripeptides Asn-X-Ser and Asn-X-Thr and of bound carbohydrate. *Biochem Biophys Res Commun* *39*, 757-765.

I

Isik, N., Hereld, D., and Jin, T. (2008). Fluorescence resonance energy transfer imaging reveals that chemokine-binding modulates heterodimers of CXCR4 and CCR5 receptors. *PLoS One* 3, e3424.

Issafras, H., Angers, S., Bulenger, S., Blanpain, C., Parmentier, M., Labbe-Jullie, C., Bouvier, M., and Marullo, S. (2002). Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors. *J Biol Chem* 277, 34666-34673.

J

Johansson, M.A., and Hellenas, K.E. (2004). Matrix effects in immunobiosensor determination of clenbuterol in urine and serum. *Analyst* 129, 438-442.

Johnson, Z., Proudfoot, A.E., and Handel, T.M. (2005a). Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 625-636.

Johnson, Z., Schwarz, M., Power, C.A., Wells, T.N., and Proudfoot, A.E. (2005b). Multi-faceted strategies to combat disease by interference with the chemokine system. *Trends Immunol* 26, 268-274.

Johnsson, B., Lofas, S., and Lindquist, G. (1991). Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal Biochem* 198, 268-277.

Jordan, B.A., and Devi, L.A. (1999). G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399, 697-700.

Juarez, J., Dela Pena, A., Baraz, R., Hewson, J., Khoo, M., Cisterne, A., Fricker, S., Fujii, N., Bradstock, K.F., and Bendall, L.J. (2007). CXCR4 antagonists mobilize childhood acute lymphoblastic leukemia cells into the peripheral blood and inhibit engraftment. *Leukemia* 21, 1249-1257.

K

Kanagarajadurai, K., and Sowdhamini, R. (2008). Sequence and structural analyses of interleukin-8-like chemokine superfamily. *In Silico Biol* 8, 307-330.

Kanbe, K., Takagishi, K., and Chen, Q. (2002). Stimulation of matrix metalloprotease 3 release from human chondrocytes by the interaction of stromal cell-derived factor 1 and CXC chemokine receptor 4. *Arthritis Rheum* 46, 130-137.

Karlsson, O.P., and Lofas, S. (2002). Flow-mediated on-surface reconstitution of G-protein coupled receptors for applications in surface plasmon resonance biosensors. *Anal Biochem* 300, 132-138.

Kawai, T., and Malech, H.L. (2009). WHIM syndrome: congenital immune deficiency disease. *Curr Opin Hematol* 16, 20-26.

Kim, J., Mori, T., Chen, S.L., Amersi, F.F., Martinez, S.R., Kuo, C., Turner, R.R., Ye, X., Bilchik, A.J., Morton, D.L., *et al.* (2006). Chemokine receptor CXCR4 expression in patients with melanoma and colorectal cancer liver metastases and the association with disease outcome. *Ann Surg* 244, 113-120.

Kim, K.S., Rajarathnam, K., Clark-Lewis, I., and Sykes, B.D. (1996). Structural characterization of a monomeric chemokine: monocyte chemoattractant protein-3. *FEBS Lett* 395, 277-282.

Kofuku, Y., Yoshiura, C., Ueda, T., Terasawa, H., Hirai, T., Tominaga, S., Hirose, M., Maeda, Y., Takahashi, H., Terashima, Y., *et al.* (2009). Structural basis of the interaction between chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 and its G-protein-coupled receptor CXCR4. *J Biol Chem* 284, 35240-35250.

Koopmann, W., and Krangel, M.S. (1997). Identification of a glycosaminoglycan-binding site in chemokine macrophage inflammatory protein-1alpha. *J Biol Chem* 272, 10103-10109.

Kortesidis, A., Zannettino, A., Isenmann, S., Shi, S., Lapidot, T., and Gronthos, S. (2005). Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells. *Blood* 105, 3793-3801.

Kretschmann, E., Raether, H. (1968). Radioactive decay of non radiative surface plasmons excited by light. *Z Naturforsch* 23, 2135-2136.

Kuschert, G.S., Coulin, F., Power, C.A., Proudfoot, A.E., Hubbard, R.E., Hoogewerf, A.J., and Wells, T.N. (1999). Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry* 38, 12959-12968.

Kuschert, G.S., Hubbard, R.E., Power, C.A., Wells, T.N., and Hoogewerf, A.J. (1997). Solid-phase binding assay to study interaction of chemokines with glycosaminoglycans. *Methods Enzymol* 287, 369-378.

L

Lagane, B., Chow, K.Y., Balabanian, K., Levoye, A., Harriague, J., Planchenault, T., Baleux, F., Gunera-Saad, N., Arenzana-Seisdedos, F., and Bachelier, F. (2008). CXCR4 dimerization and beta-arrestin-mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome. *Blood* 112, 34-44.

Laguri, C., Arenzana-Seisdedos, F., and Lortat-Jacob, H. (2008). Relationships between glycosaminoglycan and receptor binding sites in chemokines-the CXCL12 example. *Carbohydr Res* 343, 2018-2023.

Laguri, C., Sadir, R., Rueda, P., Baleux, F., Gans, P., Arenzana-Seisdedos, F., and Lortat-Jacob, H. (2007). The novel CXCL12gamma isoform encodes an unstructured cationic domain which regulates bioactivity and interaction with both glycosaminoglycans and CXCR4. *PLoS One* 2, e1110.

Lau, E.K., Paavola, C.D., Johnson, Z., Gaudry, J.P., Geretti, E., Borlat, F., Kungl, A.J., Proudfoot, A.E., and Handel, T.M. (2004). Identification of the glycosaminoglycan binding site of the CC chemokine, MCP-1: implications for structure and function in vivo. *J Biol Chem* 279, 22294-22305.

Lechertier, T., Berard, M., Vassy, R., Herve, M.A., and Crepin, M. (2004). Transendothelial migration of two metastatic breast carcinoma cells depend on the SDF-1alpha-CXCR4 complexes. *Anticancer Res* 24, 4011-4017.

Levoye, A., Balabanian, K., Baleux, F., Bachelier, F., and Lagane, B. (2009). CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood* 113, 6085-6093.

Levy, J.A. (1993). HIV and host immune responses in AIDS pathogenesis. *J Clin Apher* 8, 19-28.

Locati, M., Torre, Y.M., Galliera, E., Bonecchi, R., Bodduluri, H., Vago, G., Vecchi, A., and Mantovani, A. (2005). Silent chemoattractant receptors: D6 as a decoy and scavenger receptor for inflammatory CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 679-686.

Longo, N., Yanez-Mo, M., Mittelbrunn, M., de la Rosa, G., Munoz, M.L., Sanchez-Madrid, F., and Sanchez-Mateos, P. (2001). Regulatory role of tetraspanin CD9 in tumor-endothelial cell interaction during transendothelial invasion of melanoma cells. *Blood* 98, 3717-3726.

M

Maghazachi, A.A. (1997). Role of the heterotrimeric G proteins in stromal-derived factor-1 α -induced natural killer cell chemotaxis and calcium mobilization. *Biochem Biophys Res Commun* 236, 270-274.

Mantovani, A. (1999). The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* 20, 254-257.

Martinez Munoz, L., Lucas, P., Navarro, G., Checa, A.I., Franco, R., Martinez, A.C., Rodriguez-Frade, J.M., and Mellado, M. (2009). Dynamic regulation of CXCR1 and CXCR2 homo- and heterodimers. *J Immunol* 183, 7337-7346.

Mazzeinghi, B., Ronconi, E., Lazzeri, E., Sagrinati, C., Ballerini, L., Angelotti, M.L., Parente, E., Mancina, R., Netti, G.S., Becherucci, F., *et al.* (2008). Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells. *J Exp Med* 205, 479-490.

Mellado, M., Rodriguez-Frade, J.M., Aragay, A., del Real, G., Martin, A.M., Vila-Coro, A.J., Serrano, A., Mayor, F., Jr., and Martinez, A.C. (1998). The chemokine monocyte chemotactic protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor. *J Immunol* 161, 805-813.

Middleton, J., Neil, S., Wintle, J., Clark-Lewis, I., Moore, H., Lam, C., Auer, M., Hub, E., and Rot, A. (1997). Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* 91, 385-395.

Mittal, G.A., Joshi, V.R., and Deshpande, A. (2003). Stromal cell-derived factor-1 α in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 42, 915-916.

Moepps, B., Braun, M., Knopfle, K., Dillinger, K., Knochel, W., and Gierschik, P. (2000). Characterization of a *Xenopus laevis* CXC chemokine receptor 4: implications for hematopoietic cell development in the vertebrate embryo. *Eur J Immunol* 30, 2924-2934.

Moore, B.B., Keane, M.P., Addison, C.L., Arenberg, D.A., and Strieter, R.M. (1998). CXC chemokine modulation of angiogenesis: the importance of balance between angiogenic and angiostatic members of the family. *J Invest Med* 46, 113-120.

Morimoto, C., Romain, P.L., Fox, D.A., Anderson, P., DiMaggio, M., Levine, H., and Schlossman, S.F. (1988). Abnormalities in CD4⁺ T-lymphocyte subsets in inflammatory rheumatic diseases. *Am J Med* 84, 817-825.

Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., *et al.* (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-56.

Munoz, L.M., Lucas, P., Holgado, B.L., Barroso, R., Vega, B., Rodriguez-Frade, J.M., Mellado, M., 2011. Receptor oligomerization: a pivotal mechanism for regulating chemokine function. *Pharmacol Ther* 131(3), 351-358.

Murphy, J.W., Cho, Y., Sachpatzidis, A., Fan, C., Hodsdon, M.E., and Lolis, E. (2007). Structural and functional basis of CXCL12 (stromal cell-derived factor-1 alpha) binding to heparin. *J Biol Chem* 282, 10018-10027.

Murphy, P.M. (1994). The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* 12, 593-633.

N

Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1996a). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382, 635-638.

Nagasawa, T., Nakajima, T., Tachibana, K., Iizasa, H., Bleul, C.C., Yoshie, O., Matsushima, K., Yoshida, N., Springer, T.A., and Kishimoto, T. (1996b). Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14726-14729.

Naldini, L., Blomer, U., Gally, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267.

Nanki, T., Hayashida, K., El-Gabalawy, H.S., Suson, S., Shi, K., Girschick, H.J., Yavuz, S., and Lipsky, P.E. (2000). Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* 165, 6590-6598.

Navratilova, I., Dioszegi, M., and Myszka, D.G. (2006). Analyzing ligand and small molecule binding activity of solubilized GPCRs using biosensor technology. *Anal Biochem* 355, 132-139.

Navratilova, I., Sodroski, J., and Myszka, D.G. (2005). Solubilization, stabilization, and purification of chemokine receptors using biosensor technology. *Anal Biochem* 339, 271-281.

Neote, K., DiGregorio, D., Mak, J.Y., Horuk, R., Schall, T.J., 1993. Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor. *Cell* 72(3), 415-425.

Nervi, B., Ramirez, P., Rettig, M.P., Uy, G.L., Holt, M.S., Ritchey, J.K., Prior, J.L., Piwnica-Worms, D., Bridger, G., Ley, T.J., *et al.* (2009). Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. *Blood* 113, 6206-6214.

Nguyen, D.H., Liao, Z., Buckley, J.T., and Hildreth, J.E. (1999). The channel-forming toxin aerolysin neutralizes human immunodeficiency virus type 1. *Mol Microbiol* 33, 659-666.

Nguyen, D.H., and Taub, D.D. (2003). Inhibition of chemokine receptor function by membrane cholesterol oxidation. *Exp Cell Res* 291, 36-45.

O

Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J.M., Clark-Lewis, I., Legler, D.F., *et al.* (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 382, 833-835.

Oldham, W.M., and Hamm, H.E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 60-71.

Otto, A. (1968). Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Z Physik* 216, 398-410.

P

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., *et al.* (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739-745.

Parish, C.R. (2005). Heparan sulfate and inflammation. *Nat Immunol* 6, 861-862.

Percherancier, Y., Berchiche, Y.A., Slight, I., Volkmer-Engert, R., Tamamura, H., Fujii, N., Bouvier, M., and Heveker, N. (2005). Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J Biol Chem* 280, 9895-9903.

Petterson, S.R., and Ashbolt, N.J. (2001). Viral risks associated with wastewater reuse: modeling virus persistence on wastewater irrigated salad crops. *Water Sci Technol* 43, 23-26.

R

Rasmussen, S.G., Choi, H.J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R., Sanishvili, R., Fischetti, R.F., *et al.* (2007). Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450, 383-387.

Reiser, J., Harmison, G., Kluepfel-Stahl, S., Brady, R.O., Karlsson, S., and Schubert, M. (1996). Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15266-15271.

Rich, R.L., and Myszka, D.G. (2007). Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis. *Anal Biochem* 361, 1-6.

Roland, J., Murphy, B.J., Ahr, B., Robert-Hebmann, V., Delauzun, V., Nye, K.E., Devaux, C., and Biard-Piechaczyk, M. (2003). Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling. *Blood* 101, 399-406.

Rosenbaum, D.M., Cherezov, V., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.J., Yao, X.J., Weis, W.I., Stevens, R.C., *et al.* (2007). GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* 318, 1266-1273.

Rossi, D., and Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18, 217-242.

Rubin, J.B. (2009). Chemokine signaling in cancer: one hump or two? *Semin Cancer Biol* 19, 116-122.

Rueda, P., Balabanian, K., Lagane, B., Staropoli, I., Chow, K., Levoe, A., Laguri, C., Sadir, R., Delaunay, T., Izquierdo, E., *et al.* (2008). The CXCL12gamma chemokine displays unprecedented structural and functional properties that make it a paradigm of chemoattractant proteins. *PLoS One* 3, e2543.

S

- Sadir, R., Baleux, F., Grosdidier, A., Imberty, A., and Lortat-Jacob, H. (2001). Characterization of the stromal cell-derived factor-1alpha-heparin complex. *J Biol Chem* 276, 8288-8296.
- Salamon, Z., Wang, Y., Brown, M.F., Macleod, H.A., and Tollin, G. (1994). Conformational changes in rhodopsin probed by surface plasmon resonance spectroscopy. *Biochemistry* 33, 13706-13711.
- Salanga, C.L., and Handel, T.M. (2011). Chemokine oligomerization and interactions with receptors and glycosaminoglycans: the role of structural dynamics in function. *Exp Cell Res* 317, 590-601.
- Salcedo, R., Wasserman, K., Young, H.A., Grimm, M.C., Howard, O.M., Anver, M.R., Kleinman, H.K., Murphy, W.J., and Oppenheim, J.J. (1999). Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha. *Am J Pathol* 154, 1125-1135.
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A., and Mackay, C.R. (1998). Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 19, 568-574.
- Sarramegn, V., Muller, I., Milon, A., and Talmont, F. (2006). Recombinant G protein-coupled receptors from expression to renaturation: a challenge towards structure. *Cell Mol Life Sci* 63, 1149-1164.
- Scala, S., Ottaiano, A., Ascierto, P.A., Cavalli, M., Simeone, E., Giuliano, P., Napolitano, M., Franco, R., Botti, G., and Castello, G. (2005). Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 11, 1835-1841.
- Schnell, M.J., Johnson, J.E., Buonocore, L., and Rose, J.K. (1997). Construction of a novel virus that targets HIV-1-infected cells and controls HIV-1 infection. *Cell* 90, 849-857.
- Scotton, C.J., Wilson, J.L., Scott, K., Stamp, G., Wilbanks, G.D., Fricker, S., Bridger, G., and Balkwill, F.R. (2002). Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res* 62, 5930-5938.
- Shirozu, M., Nakano, T., Inazawa, J., Tashiro, K., Tada, H., Shinohara, T., and Honjo, T. (1995). Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28, 495-500.
- Sierro, F., Biben, C., Martinez-Munoz, L., Mellado, M., Ransohoff, R.M., Li, M., Woehl, B., Leung, H., Groom, J., Batten, M., *et al.* (2007). Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14759-14764.
- Simon, M.I., Strathmann, M.P., and Gautam, N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252, 802-808.
- Sohy, D., Yano, H., de Nadai, P., Urizar, E., Guillabert, A., Javitch, J.A., Parmentier, M., and Springael, J.Y. (2009). Hetero-oligomerization of CCR2, CCR5, and CXCR4 and the protean effects of "selective" antagonists. *J Biol Chem* 284, 31270-31279.
- Stenlund, P., Babcock, G.J., Sodroski, J., and Myszka, D.G. (2003). Capture and reconstitution of G protein-coupled receptors on a biosensor surface. *Anal Biochem* 316, 243-250.
- Szekanecz, Z., Kim, J., and Koch, A.E. (2003). Chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis. *Semin Immunol* 15, 15-21.

T

Tanaka, Y., Adams, D.H., and Shaw, S. (1993). Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol Today* *14*, 111-115.

Tashiro, K., Tada, H., Heilker, R., Shirozu, M., Nakano, T., and Honjo, T. (1993). Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* *261*, 600-603.

Teicher, B.A., and Fricker, S.P. (2010). CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* *16*, 2927-2931.

Terrillon, S., Bouvier, M., 2004. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* *5*(1), 30-34.

Turnbull, J., Powell, A., and Guimond, S. (2001). Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends Cell Biol* *11*, 75-82.

V

Valenzuela-Fernandez, A., Palanche, T., Amara, A., Magerus, A., Altmeyer, R., Delaunay, T., Virelizier, J.L., Baleux, F., Galzi, J.L., and Arenzana-Seisdedos, F. (2001). Optimal inhibition of X4 HIV isolates by the CXC chemokine stromal cell-derived factor 1 alpha requires interaction with cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* *276*, 26550-26558.

van Berkel, V., Barrett, J., Tiffany, H.L., Fremont, D.H., Murphy, P.M., McFadden, G., Speck, S.H., and Virgin, H.I. (2000). Identification of a gammaherpesvirus selective chemokine binding protein that inhibits chemokine action. *J Virol* *74*, 6741-6747.

Veldkamp, C.T., Peterson, F.C., Pelzek, A.J., and Volkman, B.F. (2005). The monomer-dimer equilibrium of stromal cell-derived factor-1 (CXCL 12) is altered by pH, phosphate, sulfate, and heparin. *Protein Sci* *14*, 1071-1081.

Veldkamp, C.T., Seibert, C., Peterson, F.C., De la Cruz, N.B., Haugner, J.C., 3rd, Basnet, H., Sakmar, T.P., and Volkman, B.F. (2008). Structural basis of CXCR4 sulfotyrosine recognition by the chemokine SDF-1/CXCL12. *Sci Signal* *1*, ra4.

Verma, I.M., and Somia, N. (1997). Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* *389*, 239-242.

Vila-Coro, A.J., Rodriguez-Frade, J.M., Martin De Ana, A., Moreno-Ortiz, M.C., Martinez, A.C., and Mellado, M. (1999). The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J* *13*, 1699-1710.

Viola, M., Quarantino, D., Gaeta, F., Rumi, G., Caruso, C., and Romano, A. (2008). Cross-reactive reactions to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Curr Pharm Des* *14*, 2826-2832.

W

- Wang, A., Guilpain, P., Chong, B.F., Chouzenoux, S., Guillevin, L., Du, Y., Zhou, X.J., Lin, F., Fairhurst, A.M., Boudreaux, C., *et al.* (2010). Dysregulated expression of CXCR4/CXCL12 in subsets of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 62, 3436-3446.
- Wehler, T., Wolfert, F., Schimanski, C.C., Gockel, I., Herr, W., Biesterfeld, S., Seifert, J.K., Adwan, H., Berger, M.R., Junginger, T., *et al.* (2006). Strong expression of chemokine receptor CXCR4 by pancreatic cancer correlates with advanced disease. *Oncol Rep* 16, 1159-1164.
- Weiss, R.A. (1987). Retroviruses and human disease. *J Clin Pathol* 40, 1064-1069.
- Weiss, R.A. (1996). Retrovirus classification and cell interactions. *J Antimicrob Chemother* 37 Suppl B, 1-11.
- Wood, R. (1999). How to validate analytical methods. *Trends Anal Chem* 18, 624-632.
- Wood, R.W. (1901). Diffraction Gratings for Gratiuitous Distribution. *Science* 13, 33.
- Wu, B., Chien, E.Y., Mol, C.D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F.C., *et al.* (2010). Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 330, 1066-1071.
- Wu, L., Gerard, N.P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A.A., Desjardin, E., Newman, W., *et al.* (1996). CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 384, 179-183.
- Wysoczynski, M., Reca, R., Ratajczak, J., Kucia, M., Shirvaikar, N., Honczarenko, M., Mills, M., Wanzeck, J., Janowska-Wieczorek, A., and Ratajczak, M.Z. (2005). Incorporation of CXCR4 into membrane lipid rafts primes homing-related responses of hematopoietic stem/progenitor cells to an SDF-1 gradient. *Blood* 105, 40-48.

Y

- Yoshiura, C., Kofuku, Y., Ueda, T., Mase, Y., Yokogawa, M., Osawa, M., Terashima, Y., Matsushima, K., and Shimada, I. (2010). NMR analyses of the interaction between CCR5 and its ligand using functional reconstitution of CCR5 in lipid bilayers. *J Am Chem Soc* 132, 6768-6777.
- Young, J.A., Bates, P., Willert, K., and Varmus, H.E. (1990). Efficient incorporation of human CD4 protein into avian leukosis virus particles. *Science* 250, 1421-1423.
- Yu, L., Cecil, J., Peng, S.B., Schrementi, J., Kovacevic, S., Paul, D., Su, E.W., and Wang, J. (2006). Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene* 374, 174-179.

Z

Zhang, J., Pekosz, A., and Lamb, R.A. (2000). Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. *J Virol* 74, 4634-4644.

Zhang, X.F., Wang, J.F., Matczak, E., Proper, J.A., and Groopman, J.E. (2001). Janus kinase 2 is involved in stromal cell-derived factor-1alpha-induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and migration of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 97, 3342-3348.

Zheng, G., Patolsky, F., Cui, Y., Wang, W.U., and Lieber, C.M. (2005). Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays. *Nat Biotechnol* 23, 1294-1301.

Zimmermann, P., and David, G. (1999). The syndecans, tuners of transmembrane signaling. *FASEB J* 13 Suppl, S91-S100.

Zlotnik, A. (2008). New insights on the role of CXCR4 in cancer metastasis. *J Pathol* 215, 211-213.

Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121-127.

Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I., and Littman, D.R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595-599.

Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L., and Trono, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15, 871-875.

